Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik der
Universität Tübingen

Direktor: Professor Dr. L. KOSLOWSKI

# AKTIVITÄT DER ADENYLATKINASE IN MUSKEL, LEBER UND ERYTHROZYTEN DES SCHWEINES UNTER HALOTHANNARKOSE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
Erich Reuter
aus Niedernhall

1980

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548921_0019

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik der
Universität Tübingen

Direktor: Professor Dr. L. KOSLOWSKI

# AKTIVITÄT DER ADENYLATKINASE IN MUSKEL, LEBER UND ERYTHROZYTEN DES SCHWEINES UNTER HALOTHANNARKOSE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
Erich Reuter
aus Niedernhall
1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. H. Heimann
Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Dr. K. Schmidt
(Professor Dr. L. Koslowski)

Für Roselinde

und meine Eltern

Herrn Priv. Doz. Dr. Dr. K. SCHMIDT danke ich für das Thema der vorliegenden Arbeit.

Neben der fachlichen Unterstützung war er auch in menschlicher Hinsicht immer hilfsbereit und trug damit Wesentliches zum Gelingen dieser Dissertation bei.

Herrn Dr. VONTIN und Herrn Dr. MÜLLER schulde ich Dank für ihre Mithilfe bei der Gewebegewinnung.

Mein Dank gilt auch den Damen, insbesondere Frl. Jobaki, des Forschungslabors der Chirurgischen Klinik, die mir bei der Erarbeitung der Labortechniken sehr behilflich waren.

# Inhaltsverzeichnis


| | | Seite |
|---|---|---|
| 1. | Einleitung und Problemstellung | 1 |
| 1.1. | Historisches | 1 |
| 1.2. | Problemstellung | 2 |
| 2. | Allgemeiner Teil | 4 |
| 2.1. | Die Adenylatkinase (AK)<br>- Name<br>- Physikalische und chemische Eigenschaften<br>- Genetik<br>- Lokalisation innerhalb der Zelle<br>- Funktion<br>- Aktivatoren und Inhibitoren<br>- Substrate<br>- Besondere Anwendungsgebiete | 4 |
| 2.2. | Die Maligne Hyperthermie (MH)<br>- Definition<br>- Häufigkeit<br>- MH - disponierende Faktoren<br>- Auslösende Agenzien<br>- Symptome<br>- Therapeutische Massnahmen<br>- Prognose<br>- Prophylaktische Massnahmen<br>- Pathophysiologie<br>- Vorstellung der Tübinger Autoren zur Entstehung der MH | 16 |

| | | |
|---|---|---|
| 3. | Material und Methoden | 33 |
| 3.1. | Untersuchungsmaterial | 33 |
| 3.1.1. | Tiermaterial | |
| 3.1.1.1. | Geräte zur Probeentnahme | |
| 3.1.1.2. | Chemikalien zur Probeentnahme | |
| 3.1.2. | Organproben | |
| 3.1.2.1. | Geräte zur Verarbeitung der Proben | |
| 3.1.2.2. | Chemikalien zur Aufarbeitung der Proben | |
| 3.2. | Methoden | 44 |
| 3.2.1. | Probeentnahme vom Tier | |
| 3.2.2. | Aufarbeitung der Proben<br>- Zellaufschluss<br>- Prinzip der Aktivitätsmessung<br>- Berechnung der Aktivität<br>- Herstellung der Lösungen und Testansatz<br>- In vitro Versuche | |
| 4. | Ergebnisse | 53 |
| 4.1. | Ergebnisse der in vivo Versuche | 53 |
| 4.1.1. | Aktivitäten der Muskelproben | |
| 4.1.2. | Aktivitäten der Leberproben | |
| 4.1.3. | Aktivitäten der festen Blutbestandteile | |
| 4.2. | Ergebnisse der in vitro Versuche | 60 |
| 4.2.1. | Passiv mit Halothan perfundierte Muskulatur | |

4.2.2. Passiv mit Rohypnol perfundierte Muskulatur
4.3. Statistik 63
4.3.1. Grundlagen der Statistik
4.3.2. Berechnung

5. Diskussion 65

5.1. Diskussion der eigenen Ergebnisse 65
5.1.1. Fehlermöglichkeiten
5.1.2. Diskussion der in vivo Versuche
5.1.3. Diskussion der in vitro Versuche
5.2. Vergleich mit anderen Ergebnissen 69
5.3. Gemeinsame Aspekte des AK - Verhaltens und des Auftretens eines MHS 71
- Entscheidendes Organ: Die Muskulatur
- Gemeinsamkeit: Erbliche Belastung
- Gemeinsamkeit: Muskelabnormitäten
- Gemeinsamkeit: Veränderte Adeninnukleotid - Werte
- Denkbarer Mechanismus
- Mögliche Aktivitätsänderung der AK auf der Ebene der Enzymstruktur
- Ist eine AK - Inaktivierung durch Halothan möglich
- Möglichkeit der Auslösung von MH über eine Inaktivierung der AK nach dem Modell der Tübinger Autorengruppen
- Schlussfolgerungen

6. Zusammenfassung 79

7. Tabellen 82

7.1. Probematerial: Blut 82

7.2. Probematerial: Leber 83

7.3. Probematerial: Muskel 84

7.4. In vitro Versuch 85

8. Literaturverzeichnis 86

# 1. Einleitung und Problemstellung

## 1.1 Historisches

Vor nunmehr 140 Jahren, 1836, assoziierte Berzelius erstmals "Leben" mit "katalytischer Kraft". Er schrieb:"Wir bekommen begründeten Anlass zu vermuten, dass in den lebenden Pflanzen und Tieren Tausende von katalytischen Prozessen zwischen den Geweben und Flüssigkeiten vor sich gehen und die Menge ungleichartiger Zersetzungen hervorbringen, die wir künftig vielleicht in der katalytischen Kraft des organischen Gewebes entdecken werden."

Die angesprochenen katalytischen Kräfte nannte Kühne im Jahre 1878 "Enzyme" und erst 90 Jahre nach Berzelius folgte der endgültige Beweis des Proteincharakters der Enzyme mit der von Sumner kristallisiert dargestellten Urease.

Rückblickend kann man heute sagen: Berzelius hat in jeder Hinsicht mit seiner Voraussage recht behalten. "Leben" wird heute im Verbund von Stoffwechsel und Vermehrung gesehen, beide Fähigkeiten werden ausschliesslich durch Enzyme ermöglicht.

Da heute etwa 2000 Enzyme bekannt sind, ist auch in dieser Hinsicht grössenordnungsmässig Berzelius' Voraussage eingetroffen (153).

Mit einem dieser 2000 Enzyme beschäftigt sich die vorliegende Arbeit.

Es ist die 1943 von COLOWICK et al.(39) erstmals beschriebene Myokinase. Myokinase deshalb, weil das Enzym zunächst aus dem Kaninchenmuskel isoliert wurde. Heute weiss man jedoch, dass dieses Enzym ubiquitär vorkommt. Es ist in Zitronen und im Weizen ebenso zu finden, wie z.B. in der Bäckerhefe und in den Muskeln von Insekten (114).

Es war somit wissenschaftlich nicht mehr vertretbar, den Namen Myokinase beizubehalten und so wurden seiner katalysierenden Reaktion entsprechend Bezeichnungen wie Phosphat - Dismutator, ATP - AMP - Transphosphorylase, ADP - ADP Transphosphatase u.a. vorgeschlagen (74, 114).

Heute ist nur noch der von COLOWICK verwendete Name Adenylatkinase (AK) gebräuchlich und nur für die im Muskel gefundene AK wird gelegentlich noch der vom Entdecker verwendete Name "Myokinase" gebraucht (37).

Auf die zwischenzeitlich gefundenen Isoenzyme der AK wird im nachfolgenden Kapitel noch näher eingegangen werden.

## 1.2. Problemstellung

Inzwischen gibt es eine Vielzahl von Publikationen, die sich mit den Eigenschaften und der Funktion dieses Enzyms beschäftigen. Drei besonders interessant erscheinende wurden von den Tübinger Autorengruppen SCHMITT 1974 (132), JUNGER 1975 (77) und KRAEMER 1978 (89), veröffentlicht. Danach soll ein Zusammenhang zwischen AK - Defizienz und einer bei Narkosen auftretenden seltenen Komplikation, der malignen Hyperthermie, bestehen.

Den Anstoss zu dieser Annahme gaben zwei Fälle, in deren Verlauf von einer 6 - köpfigen Familie zwei Brüder nach einer Halothan - Narkose an maligner Hyperthermie starben. In einer Untersuchung der vier noch lebenden Familienmitglieder wurde bei Mutter und Tochter eine AK - Defizienz gefunden.

Dieses Krankheitsbild der malignen Hyperthermie (MH), das gelegentlich auch als malignes Hyperthermie - Syndrom (MHS) und maligne Hyperpyrexie bezeichnet wird ( 31,36,45) ist seit der Beschreibung durch Guedel im Jahre 1951 bekannt.

Heute weiss man, dass MH durch bestimmte Medikamente hervorgerufen wird, wobei das Halothan wohl das häufigste sein dürfte. Es ist deshalb nicht weiter verwunderlich, dass die Einführung der Halothannarkosen in der Klinik im Jahre 1956 die Fälle von MH sprunghaft ansteigen liess und die Anaesthesisten nur allmählich bemerkten, dass das von ihnen verwendete Halothan die Ursache dieser oft tödlich verlaufenden Komplikation darstellte.

So berichtet z.B. DENBOROUGH et al. 1962 (48) von einer Familie, die innerhalb kurzer Zeit von 10 Todesfällen nach Allgemeinanaesthesien betroffen wurde. Nach und nach folgten weitere Fall - Berichte, die zunächst die Symptome beschrieben und später auch die Ursache für diese rätselhafte Komplikation zu erforschen suchten ( 31,45,52,59,73,107,131).

Auch mit der vorliegenden Arbeit soll versucht werden, die Hintergründe der MH genauer zu untersuchen, um eine eventuelle Verbindung zwischen MH und Adenylatkinase, wie sie von den oben genannten Autoren für möglich gehalten wird, weiter zu untermauern.

Anhand von in vivo Experimenten an Schweinen wird die mögliche Beeinflussung der Adenylatkinase durch das hochpotente Inhalationsnarkotikum Halothan geprüft.

Zunächst soll aber der Stand der bisherigen Erkenntnisse sowohl über die Adenylatkinase als auch über die maligne Hyperthermie dargelegt werden.

# 2. Allgemeiner Teil

## 2.1. Die Adenylatkinase (AK)

### Name

Adenylatkinase ist der Trivialname für ein phosphattransferierendes Enzym, das wissenschaftlich als ATP : AMP Phospotransferase (EC 2. 7. 4. 3) bezeichnet wird.

### Physikalische und chemische Eigenschaften

Als physikalische Besonderheit fällt zunächst die ungewöhnliche Hitze- und Säurestabilität auf. Bei isolierter AK geht jedoch die Hitzestabilität verloren, wenn die -SH Gruppen nicht mit thiolschützenden Gruppen (z.B. Cystein) versehen sind (17,32,113).

Bei dreidimensionaler Betrachtung stellt sich das Enzym kugelförmig dar. Es zerfällt durch eine Spalte in zwei Teile. Während der Katalyse sind die Substrate in dieser Spalte gebunden.

Nach Untersuchungen von SACHSENHEIMER et al. (128) wird Halothan in der hydrophoben Tasche des Enzyms an der Bindungsstelle des AMP gebunden.

Die Anzahl und Sequenz der einzelnen Aminosäuren ist bekannt (101,104), schwankt aber je nach Herkunft zwischen 191 und 248. Myokinase vom Menschen besteht aus 194 Aminosäuren (144).

Die Anzahl und Position der Cystein - Aminosäuren führen zu einem wichtigen Unterschied zwischen Leber - und Muskel - AK.

Beim Muskel existieren die zwei -SH - Gruppen des Cystein als reaktionsfähige Teile, die durch -SH - Reagenzien reversibel besetzt werden können (90,91,102), während in der Leber - AK keine Sensibilität gegenüber -SH - Reagenzien bekannt ist (35,114,130).

Behandelt man z.B. Musekl - AK mit Ellman's Reagenz, so kommt es zu einer vollständigen Inaktivierung, während die Leber - AK von diesem - SH - Reagenz unbeeinflusst bleibt (114, 130).

Dieses Verhalten dürfte darauf zurückzuführen sein, dass die vier - SH - Gruppen der Leber - AK zwei Disulfid - Brücken ( - S - S -) bilden und somit keine Aktivität entfalten (104, 105).

Das Molekulargewicht (MG) der AK schwankt infolge der variierenden Aminosäuren - Anzahl geringfügig, beträgt jedoch im Mittel etwa 21 000 Dalton. AK ist damit das kleinste der zur Zeit bekannten Phosphat - transferierenden Enzyme, alle anderen haben ein MG zwischen 40 000 - 100 000 Dalton (134).

Studien von CRISS et al. ergaben jedoch, dass AK auch als Dimer, Trimer und Tetramer vorliegen kann (42,43). Seine Gruppe fand, dass AK aus Lebertumorgewebe als Dimer mit zwei Untereinheiten (MG je 13 000) existiert, bei normalem Lebergewebe dagegen als Trimer mit ebenfalls zwei Untereinheiten zu je 13 000 und einer dritten Einheit mit einem MG von 11 000 vorliegt.

Sie schlossen daraus, dass diese dritte Untereinheit eine Regulatorfunktion erfüllt, zumal nur dieses Trimer durch Citrat stark aktiviert wird, nicht aber das Tumor- und Muskelenzym, die diese Regulatoreinheit nicht besitzen.

Bei der Muskel - AK scheint es grundsätzlich keine Polymere zu geben, da weder beim Menschen noch bei anderen Tieren ein höheres Molekulargewicht als 21 500 festgestellt werden konnte.

Weitere Eigenschaften wie z.B. Isoelektrischer Punkt, Gleichgewichtskonstante, Michaelis - und Inhibitorkonstante spezifische Aktivität, N - Gehalt u.a. mögen aus Tabellen entnommen werden (7,114,144).

Genetische Eigenschaften

Da AK ubiquitär, also auch in den einfach zu gewinnenden Erythrozyten vorkommt, verging nur eine kurze Zeit, bis genauere Untersuchungen bezüglich genetischer Eigenschaften erfolgte.

Dabei wurden mehrere Isoenzyme der AK im Erythrozyten gefunden.

FILDES et al. (57) entdeckten 1966 drei elektrophoretisch unterscheidbare Isoenzyme und nannten diese AK 1, AK 2-1 und AK 2; inzwischen wurden auch die sehr seltenen Isoenzyme AK 3-1 und AK 4-1 beschrieben (18). Die Gruppe stellte fest, dass sich in jedem Individuum phänotypisch Muskel- und Erythrozyten - AK entsprachen, wenngleich die Aktivität im Muskel höher war als im Erythrozyten - Lysat.

Das Ergebnis seiner Untersuchungen an Erythrozyten - AK zeigte die Isoenzymverteilung in der englischen Bevölkerung, wo 90 % das Isoenzym AK 1 aufwiesen, 10 % das Enzym AK 2-1 und nur sehr wenige (0,025 %) AK 2.

Von weiteren Autoren wurden diese Ergebnisse bestätigt, sie fanden eine ähnliche Isoenzymverteilung bei verschiedenen Rassen und Völkern (5,9,136,145,147).

Bezüglich der Aktivität zeigten RAPLEY et al. (124) sowie MODIANO und Mitarbeiter (108) übereinstimmend, dass die Aktivität der Erythrozyten - AK von Menschen mit Phänotyp AK 1 20 % höher liegt, als die von solchen mit Phänotyp AK 2-1.

FILDES et al. sowie andere Autoren vermuteten deshalb, dass AK 1, AK 2-1 und AK 2 durch Allele bestimmt und autosomal vererbt würden (30,55). Danach sollten zwei autosomale Allele mit der Bezeichnung $AK^1$ und $AK^2$ existieren, die je nach Homo-

bzw. Heterozygotie zu den Phänotypen AK 1 ($AK^1$ $AK^1$), AK 2-1 ($AK^1$ $AK^2$) und AK 2 ($AK^2$ $AK^2$) führen, obwohl z.B. MODIANO nie eine Homozygotie von AK 2 fand.

Neuere Untersuchungen widerlegen jedoch diese Ergebnisse und weisen nach, dass im Menschen kein einheitliches Enzymmuster vorliegt, sondern organspezifische Unterschiede auftreten, die durch verschiedene Genloci determiniert werden (120,150).

Die Gruppen POVEY (120) und WILSON (150) lokalisierten AK 1 (entsprechend AK 1 und AK 2-1 von FILDES) auf Chromosom 9, AK 2 (entsprechend AK 2) liegt dagegen auf Chromosom 1. Bemerkenswert ist dabei die Tatsache, dass AK 1 immer in AK 1 und AK 2-1 differenziert werden konnte, während dies bei AK 2 in keinem der untersuchten Fälle mehr möglich war.

Es kann somit erwartet werden, dass, abhängig von der Penetranz in den einzelnen Geweben, die verschiedenen Isoenzyme organspezifische Muster bilden.

AK 1 und AK 2 (nach der Bezeichnung von POVEY) fanden sich in Leber Herz und Niere, wenn auch in verschiedenen Aktivitätsverhältnissen. Beispielsweise war die AK 2 Aktivität in der Leber wesentlich höher als die AK 1 Aktivität.

Demgegenüber fand sich im Skelettmuskel, im Erythrozyt und im Gehirn nur AK 1.

Dies führte zur Bezeichnung von Sets (Set 1 = Skelettmuskulatur, Erythrozyt, Gehirn; Set 2 = Leber, Herz, Niere), von denen im Menschen mindestens zwei vorliegen sollen (28,83, 84).

Lokalisation innerhalb der Zelle

CRISS (41), der sich mit der intrazellulären Lokalisation

der AK beschäftigte, findet zwar auch eine Set - ähnliche Verteilung, er und seine Mitarbeiter kennzeichneten jedoch die verschiedenen AK - Formen, unabhängig von früheren Bezeichnungen, mit den römischen Ziffern I - IV (44, 129), sodass ein Vergleich mit Angaben anderer Autoren nicht ohne weiteres möglich ist.

In ihren Untersuchungen zeigte die Gruppe um CRISS, an neun verschiedenen Organen, dass die Aktivität der Isoenzyme nicht nur mit der Organherkunft variierte (77,92,143,146), sondern dass auch deren subzelluläre Lokalisation von Organ zu Organ sehr stark schwankte.

Zwar hatte schon 1951 KIELLEY (85) die AK in Lebermitochondrien nachgewiesen und BRDICZKA et al. 1968 mit besonderen Methoden die AK im intercristären Raum, d.h. zwischen der Doppelmembran der Lebermitochondrien lokalisiert, unklar blieb aber bis zur Arbeit von CRISS die Verteilung der Isoenzyme in der Leber und das Verhalten der AK in anderen Organen.

Er und andere Autoren fanden in der Muskelzelle den grössten Teil der Gesamtaktivität im Zytoplasma (81,87,148), in der Leber jedoch war der überwiegende Teil in den Mitochondrien und dort im äusseren mitochondrialen Kompartiment zu finden (40,42).

Von den Isoenzymen AK I - IV waren I und IV mit einem sehr geringen Anteil in allen Geweben vertreten (AK I bis 3,5%; AK IV bis 1 %). AK II fand sich vorwiegend im Zytoplasma des Muskels, AK III dagegen überwiegend intramitochondrial in der Leber, woraus zu schliessen ist, dass im Muskel das Isoenzym AK II dominiert, in der Leber aber Isoenzym AK III.

Aus der folgenden Tafel geht in übersichtlicher Form nochmals die Verteilung der AK - Isoenzyme hervor.

| Organ | Isoenzyme (U/g) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | I | II | III | IV | Summe |
| Niere | 5 | 10 | 62 | 1 | 78 |
| Leber | 6 | 27 | 110 | 3 | 148 |
| Hoden | 1 | 2 | 7 | 1 | 9 |
| Uterus | 1 | 12 | 4 | 1 | 16 |
| Lungen | 1 | 20 | 6 | 1 | 26 |
| Gehirn | 11 | 34 | 6 | 1 | 51 |
| Diaphragma | 1 | 75 | 8 | 1 | 83 |
| Skelettmusk. | 5 | 368 | 28 | 1 | 401 |
| Herz | 2 | 140 | 9 | 1 | 151 |

Tafel 9.I. AK Isoenzymverteilung in Rattenorganen (41)

Funktion

AK ist ein Katalysator, d.h. sie beschleunigt die Reaktion der Umwandlung von ADP in AMP + ATP und umgekehrt (Gl.9.1.).

$$ADP \underset{}{\overset{AK}{\rightleftharpoons}} ATP + AMP \qquad \text{(Gl. 9.1.)}$$

Das Gleichgewicht wird durch AK nicht verschoben, sie bewirkt nur eine raschere Einstellung des Gleichgewichtszustandes.

Für die stark energieverbrauchenden Zellen im Muskel und in der Leber ist damit eine stets ausreichende Bildung von ATP gewährleistet.

Es erfolgt eine sehr schnelle ATP - Bereitstellung aus ADP, wenn ATP, das als universeller Energielieferant im ganzen Körper dient, benötigt wird.

Folgendes Beispiel möge dies veranschaulichen:

In Anwesenheit von 1 µg AK (Myokinase) pro ml Inkubationslösung ist innerhalb von 2 min, mit reinem ADP als Substrat, das Gleichgewicht nahezu erreicht, d.h. etwa 2/3 des ursprünglichen ADP sind zu ATP und AMP dismutiert, während ohne AK noch nach 10 min keine wesentliche Mengen ATP bzw. AMP entstanden waren.

Aufgrund dieser Tatsache, nämlich der schnellen Bereitstellung von ATP, kommt es zu einer Konstanthaltung des Verhältnisses der Adeninnukleotidkonzentsationen untereinander, mit einem hohen ATP - Anteil.

Deshalb vermuteten schon 1954 einige Autoren in der AK einen Muskelweichmacher, der durch ATP - Bereitstellung die zur Muskelkontraktion nötige Energie lieferte (8,93).

Erst etwa zehn Jahre später postulierten ATKINSON et al. (4) ihr "Adenylate Energy Charge" - System. Sie betrachteten die Adeninnukleotide mit ihren vielfältigen Feedback - Mechanismen als das wichtigste zentrale Kontroll- und Regelsystem, das bisher in der Säugetierzelle gefunden wurde.

Danach sollte die "Energy Charge" der Zelle gleich 1 sein, wenn der gesamte Adenin - Nukleotid - Pool in Form von ATP vorliegt und die Zelle die "Energy Charge" O haben, wenn nur noch AMP vorliegt. Dieser Sachverhalt wird von ATKINSON durch Gl. 10.1. beschrieben, die dazugehörige graphische Darstellung ist aus Abb. 10.1. ersichtlich.

$$\text{Adenylate Energy Charge} = \frac{(ATP) + 1/2\ (ADP)}{(ATP) + (ADP) + (AMP)} \quad \text{(Gl. 10.1.)}$$

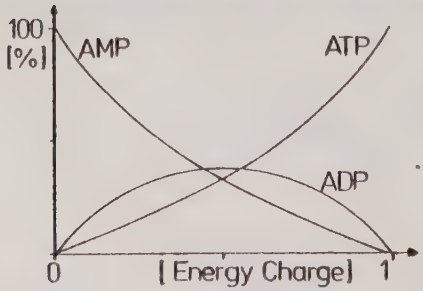


Abb. 10.1.
Abhängigkeit der Adeninnukleotidkonzentrationen von der Adenylate Energy Charge (3)

Berücksichtigt man weiterhin, dass die AK jedes beliebige Gleichgewicht zwischen den Adenosinen und damit jede "Energie Charge" aufrechterhalten kann, so ist erkenntlich, welch wichtiger Faktor die AK in der Zelle darstellt (6,41,44).

So werden Enzyme der Glykolyse oder des Zitronensäurezyklus durch ATP inhibiert, bzw. durch AMP stimuliert und umgekehrt, während andererseits eine konzentrationsabhängige Änderung der AK - Aktivität durch jedes Zwischenprodukt des Zitronensäurezyklus stattfindet (2,3,121). Damit wird durch die AK eine indirekte Kontrolle über den gesamten Metabolismus ausgeübt und die Homoeostase aufrecht erhalten.

Von DERR und seinen Mitarbeitern wurde im Gehirn von Ratten für die "Adenylate Energy Charge" ein physiologischer Wert von 0,85 gefunden, das entspricht einem Verhältnis von ATP : ADP : AMP = 75 % : 20 % : 5 % (49).

Dieser Wert bleibt unter physiologischen Bedingungen relativ konstant (114), es sollte jedoch nicht ausser Acht gelassen werden, dass dieses Regelsystem noch von sehr vielen weiteren Faktoren beeinflusst werden kann (123).

Aktivatoren und Inhibitoren

Neben den oben schon erwähnten Metaboliten wirken auf die AK viele weitere Stoffe ein, die zu einer Aktivierung oder auch Inaktivierung derselben führen.

SUGANO et al. (138) zeigten, dass durch $Mg^{++}$ - Ionen die Atmung zentral stimuliert wird, beruhend auf einer AK - Aktivierung. Auch von anderen Autoren wurde der stimulierende Einfluss von Ionen auf die Aktivität gefunden, wobei jedoch nur zweiwertige Metallionen ($MG^{++}$, $Ca^{++}$, $Mn^{++}$, $Co^{++}$) von Bedeutung sind, die mit den Polyphosphat - Nukleotiden einen Komplex bilden (13,34,113,114).

Neben diesen Aktivatoren sind zusätzlich Inhibitoren wirksam, die die AK kompetetiv oder auch irreversibel zu hemmen vermögen. Die Skala reicht von Ionen über einfache organische Moleküle bis hin zu komplizierteren Nukleotid - Strukturen.

Nach COLOWICK und SIKEVITZ et al. wird eine Aktivitätsminderung schon durch Fluorid ($F^-$) hervorgerufen. Die Wirksamkeit dieser Hemmung zeigt die Anwendung im Labor, wo diese $F^-$ - Inhibition zur Ausschaltung der Interferenz zwischen AK und CPK bei der CPK - Messung herangezogen wird (38,135, 140).

Die Citrat - Hemmung dürfte auf eine Mg - Citrat Verbindung zurückzuführen sein, somit also eine $Mg^{++}$ - Aktivierung unmöglich machen.

Auf die Inhibition mit -SH - Reagenzien wurde schon oben eingegangen, der Vollständigkeit wegen sei hier nochmals die (reversible) Oxidation durch $H_2O_2$, sowie die Oxidation reiner AK bei Berührung mit Glas oder Cellophan erwähnt (32,39).

Auch im Zigarettenrauch sind Verbindungen (möglicherweise das Nikotin) enthalten, die über die AK - Inhibition zur Funktionsunfähigkeit der Cilien in der Trachea führen (1+6).

Als Inhibitoren sind auch die Substrate (ADP, ATP, AMP) wirksam, damit kann auf eine Endprodukt - Hemmung während der Katalyse geschlossen werden (83,66).

1972 zeigten PURICH und Mitarbeiter (122), dass zwei über vier Phosphat - Gruppen verbundene Adenosine ($Ap_4A$) zu einer kompetetiven Hemmung an der Kaninchenmuskel - AK führen. Weitere Studien ergaben eine noch bessere Inhibition mit $Ap_5A$, wenn also fünf Phosphat - Gruppen das Verbindungsglied dar-

stellen (96). SACHSENHEIMER et al. (127) benutzten dieses $Ap_5A$ zur selektiven Inhibition der AK aus Erythrozyten, Herz- und Skelettmuskulatur, während Leber - AK davon unbeeinflusst bleibt. Dessen ungeachtet wollen LÜSTORFF und SCHLIMME auch eine Hemmung der Leber - AK durch $Ap_5A$ beobachtet haben (100).

Schliesslich ist eine weitere Inaktivierung durch Wärme in der Literatur beschrieben, allerdings nur in einer mutierten E. coli. Dabei war nach Überschreiten einer bestimmten Temperatur ein Abfall in der RNA -, DNA - und Proteinsynthese mit einer gleichzeitigen Änderung der Adenosinverhältnisse, allesamt bedingt durch die AK - Inaktivierung, festzustellen (61).

Substrate

Als Substrate dienen primär Adeninnukleotide, also in der Vorwärtsreaktion (Gl. 9.1.) ADP und in der Rückwärtsreaktion ATP und AMP (83).

Bietet man in der Vorwärtsreaktion nur Nichtadeninnukleotide an, so erfolgt kein Substratumsatz, ist jedoch ein ADP beteiligt, werden auch die übrigen vier Nukleotiddiphosphate mitumgesetzt (35, 112).

Bezüglich der Rückwärtsreaktion sind die Ergebnisse weniger eindeutig.

CHIGA et al. (35) zeigen, dass nur AMP als Phosphatakzeptor dient (bei ATP als Donator), ADELMANN und seine Mitarbeiter erhielten jedoch auch mit CMP, TMP, IMP und GMP umsétzungen (1). Neuere Forschungen scheinen jedoch die Ergebnisse von CHIGA zu bestätigen (150).

Eine Regel besagt: Substitution der Basen beim Triphosphat führt zu einer geringen Inaktivierung, ersetzt man dagegen

beim Monophosphat die Adenin - Basen, so führt dies zu einem sehr starken Aktivitätsverlust (114).

Besondere Anwendungsgebiete

Abschließend seien einige Gebiete erwähnt, in denen die AK - Aktivitätsbestimmung zu diagnostischen oder therapeutischen Zwecken von Nutzen sein könnte, die aber möglicherweise auch in Verbindung mit dem Krankheitsbild der malignen Hyperthermie gesehen werden müssen.

Untersuchungen von mehreren Autoren deuten darauf hin, dass die Aktivität von schneller wachsenden Hepatomen geringer ist, als bei langsam sich teilenden und normalen Leberzellen (44,118).

Weiteren Arbeiten zufolge handelt es sich dabei um ein AK - Molekül mit nur zwei Untereinheiten, obwohl in der Leber drei die Norm bedeuteten (42,43). Die Intermediärprodukte der Zitronensäurezyklus finden nach Verlust dieser Regulatoreinheit keinen Angrifsspunkt mehr, die Kontrollfunktion der jetzt zu niedrigen AK - Aktivität ist nicht mehr ausreichend.

Auch im Blut wurde schon mehrfach eine AK - Defizienz nachgewiesen, die Aktivität bei diesen Kranken schwankte zwischen 1 - 10 % der normalen Erythrozyten - Aktivität (15,141,142). Bei allen Personen kam es zu einer Anämie verschiedener Ausprägung, dennoch konnte bisher noch kein Zusammenhang zwischen AK - Defizienz und Anämie entdeckt werden.

MAINZER et al. fand im Serum eine sehr geringe AK - Aktivität, es lag deshalb nache, ähnlich dem Leberenzymen, einen möglichen Anstieg im Serum diagnostisch zu verwerten, sofern die AK - Herkunft ausreichend spezifisch ist (103).

SCHMIDT regte deshalb an, mit dieser Methode eine mögliche frühe Diagnose des Herzinfarktes zu schaffen (131), da schon

innerhalb er ersten Stunde ein deutlicher Serum - AK - Anstieg zu sehen war, nach 10 - 18 Stunden einen Gipfel zeigte (CPK - Gipfel erst nach zwei Tagen) und dann sehr schnell wieder aus dem Blut eliminiert wurde (Halbwertszeit im Serum ca. 7 min) (95,127,133).

Leider sind Störungen durch andere Krankheiten, die ebenfalls einen AK - Anstieg bewirken und hämolytische Seren zu befürchten, sodass eine routinemässige Serum - AK - Bestimmung bisher nicht sinnvoll erscheint (79).

Ein weiteres, geradezu prädestiniertes Gewebe in dem mit deutlichen AK - Normabweichungen zu rechnen ist, stellt die Muskulatur dar. Wie oben schon ausführlich dargelegt, enthalten die Muskelzellen die höchste AK - Aktivität des Körpers (vgl. Tafel 9.1.), es ist somit bei Muskelalterationen jeglicher Art ein Serumanstieg, bzw. intramuskulärer Aktivitätsabfall zu erwarten.

Tatsächlich ist schon bei Muskelmassage und stärkerer körperlicher Belastung ein Serum - AK - Anstieg zwischen 26 % und 37 % nachzuweisen (16,80).

Weiterhin wurde ein signifikanter Aktivitätsabfall intramuskulär auch bei bestimmten Muskelerkrankungen, den sogenannten dystrophischen Muskelerkrankungen (z.B. Typ Duchenne) von verschiedenen Autoren gezeigt (72,86,94,146), ausserdem wiesen SCHIRMER und Mitarbeiter nach, dass AK aus dystrophischer Muskulatur von bestimmten chemischen Verbindungen (Ellman's Reagenz) nur zu 40 - 60 % inaktiviert wird, während bei normaler AK damit eine völlige Inaktivierung erfolgt (130).

Diese Muskelerkrankungen haben alle eine Gemeinsamkeit: einen Membrandefekt, der nachweislich auch in Erythrozyten und Leberzellen vorliegt (78).

Damit ist eine mögliche Ursache für den erhöhten AK - Abfluss aus der Zelle gegeben, denn auch CPK, ein der AK ähnliches Enzym, wird aus der Zelle freigesetzt und im Serum erhöht gefunden.

Bezeichnenderweise ist aber gerade diese Muskeldystrophie auch bei der anschliessend zu besprechenden malignen Hyperthermie ein wichtiger Aspekt, sowohl für die Ätiologie als auch für prophylaktische Massnahmen dieser Narkosekomplikation.

## 2.2. Die Maligne Hyperthermie (MH)

### Definition

Die MH wird von ELLIS et al. (53) definiert als: "Unerklärliches Fieber während der Anaesthesie, bei einem Temperaturanstieg von mindestens $2^{o}C$/Std. Die meisten Patienten zeigen eine Muskelkontraktur, Azidose und Hyperkaliämie".

### Häufigkeit

Die Häufigkeit des malignen Hyperthermie - Syndroms (MHS) ist vom Alter, Geschlecht und der erblichen Belastung des Patienten abhängig.

Bei Kindern und jungen Menschen ist es häufiger zu finden, (1 : 15 000), als etwa bei Erwachsenen (1 : 50 000 - 1 : 75 000) (33,119).

Bei der Auswertung von 186 MH - Patienten zeigte sich ein deutlicher Gipfel in den ersten drei Lebensjahrzehnten. Ausserdem scheint das maskuline Geschlecht wesentlich häufiger betroffen zu sein als Frauen und Mädchen. In der oben erwähnten Studie waren 75 % männlich, mit einem Gipfel bei 20 Jahren. Bei den weiblichen Patienten ist das Maximum um die 10 - Jahresschwelle verteilt (10,119).

Die Letalität ist, gemessen an den oftmals geringfügigen Ein-

griffen (allgemein chirurgische-, otorhinolaryngologische-, Knochen-Operationen usw.), sehr hoch. Im Durchschnitt muss mit einer Letalität von 60 - 70 % aller MH - Patienten gerechnet werden (22).

Statistisch ist das Vorkommen unter der Bevölkerung nicht gleich verteilt, sondern es kommt zu familiärer Häufung. Innerhalb einer Familie kam es nach Allgemein - Narkosen zu mehreren Todesfällen (48,75,132).

Anhand von Stammbäumen und der Zahl der recherchierten MHS - Fälle kann als gesichert gelten, dass MH autosomal - dominant vererbt wird, wenn auch mit verminderter Penetranz und variabler Expressivität (14,47,88).

MH - disponierende Faktoren

Das Auftreten der MH ist von weiteren, teilweise noch unbekannten Faktoren abhängig, da z.B. Patienten, die früher schon eine oder mehrere Allgemein - Narkosen mit Halothan erhalten hatten, diese ohne Komplikationen überlebten und es dann während einer neuerlichen Anaesthesie zur MH kam (21,126).

BROWN et al. vertreten die Meinung, dass Alkohol möglicherweise das Risiko einer MH - Komplikation erhöht, wenn bisher auch noch keine exakten Beweise erbracht wurden (29).

Genauere Untersuchungen liegen über einen anderen MH - disponierenden Faktor, der Stress - Belastung vor.

Bei Schweinen gibt es bestimmte Rassen die als besonders MH - empfindlich gelten und LISTER et al. (97) zeigten, dass nach Stress - Belastung (Aufregung, erhöhte Umgebungstemperatur) diese Schweine überdurchschnittlich oft an MH - ähnlichen Symptomen leiden (68). Auch in den von HENDE und seinen Mitarbeitern angestellten Versuchen zeigten sich schneller und stärker MH - Symptome, wenn die Schweine vorher physisch belastet worden waren.

Messungen der Catecholamine im Blut zeigten dann auch eine starke Erhöhung dieser Stoffe. Durch Reserpin (verhindert Noradrenalin - Rückresorption in die Granula) oder Phentolamin (Adrenalin - Antagonist) wurde bei den Schweinen ein MHS verhindert, beruhend auf einer geringeren Catecholaminwirkung (109).

WINGARD machte ähnliche Versuche am Menschen, mit übereinstimmenden Ergebnissen. Er untersuchte 77 Mitglieder einer MH - verdächtigen Familie und fand die meisten sympathikoton, tachykard, acrocyanotisch mit labilem Blutdruck. Neun Personen starben an MH, andere Familienmitglieder waren plötzlich mit ungeklärter Todesursache gestorben (131).

Auch bestimmte muskuloskelettäre Abnormitäten wie z.B. Strabismus, Ptosis, Eyphoskoliose, spontane Hernien und allgemeine Myopathien zeigen eine enge Korrelation mit dem MH - Syndrom (22,156).

Dabei nehmen die Myopathien wohl eine Sonderstellung ein. Zahlreiche Autoren stellten nach MH - Komplikationen bei den Patienten eine Abnormität der Muskulatur fest (12,53,59,107). Unklar ist jedoch, ob eine Myopathie Voraussetzung für ein MHS ist (51,56), oder ob sie nur ein häufiger Nebenbefund darstellt (29,33).

Auslösende Agenzien

Wie schon eingangs erwähnt, stellt Halothan das wichtigste, die MH - triggernde Medikament dar. Obwohl bisher kein eindeutiger Beweis über die molekulare Wirkung des Halothans vorliegt, muss man, ausgehend von den vielen Tierexperimenten und den Komplikationen am Menschen nach Halothanexposition annehmen, dass dieses Narkotikum, bzw. seine Abbauprodukte, bei bestimmten Patienten in der Lage ist, aus einer vorher harmlos erscheinenden Operation eine lebensbedrohliche Situation entstehen zu lassen.

Neben Halothan gibt es noch eine Reihe weiterer Drogen, die als Auslöser einer MH beschrieben wurden, wie z.B. die zu den stark wirkenden Inhalationsanaesthetika zählenden Medikamente Methoxyfluran (Pentrane (R)), Enfluran (Ethrane (R)), Cyclopropan und sogar der veraltete Äther (19,117,139).

Ausser diesen Inhalationsnarkotika kommen Muskelrelaxantien wie Succinylcholin, Curare, Atropin und Gallamin in Frage (14,110).

Weniger häufig wurden weitere Medikamente von verschiedenen Autoren beschrieben, so die Injektionsnarkotika wie Barbiturate (Thiopental (R)), Ketamin (Ketanest (R)), Propanidid (Epontol (R)), das Schmerzmittel Pethidin (Dolantin (R)) und nicht zuletzt der Tranquilizer Diazepam (Valium (R)) (10,125).

ELLIS und CLARKE glauben sogar ein MH - Syndrom nach $N_2O$ - Gabe gefunden zu haben, zeigen jedoch in einer späteren Arbeit, dass sich das im Gummi der Narkoseapparatur gelöste Halothan zur MH führen kann (32), womit möglicherweise manche der oben genannten Mittel auszuscheiden sind (53).

Symptome

Kommt es trotz aller Vorsicht zu einem MH - Syndrom, so ist für eine gute Prognose das sofortige Erkennen von grösster Wichtigkeit. Frühzeichen einer MH sind schlechte Relaxation der Kiefermuskulatur (spürbar bei Intubationsversuch) nach Succinylcholin - Gabe, auffallend steife Muskulatur am ganzen Körper, ungeklärte Tachykardie, Tachypnoe, periphere Cyanose und als Leitsymptom (leider nicht sofort) ein Anstieg der Körpertemperatur um als $1^{o}$ C (in schweren Fällen $1^{o}$ C/5 min (60) ) mit Erwärmung des Atemkalkkanisters (154).

Im weiteren Verlauf kommt es, bei nicht erkanntem Krankheitsbild zur extremen Steigerung der Temperatur bis 45 $^{o}$C (126),

starkem Rigor, Blutungen am ganzen Körper und im Terminalstadium zu Extrasystolen, Arrhythmien mit Blutdruckabfall und Herzstillstand.

Neben diesen Fällen der MH mit Rigidität gibt es einige wenige, die nicht mit einem Rigor einhergehen (22,139).

Diese nichtrigide MH teilt BRITT in zwei Gruppen:

a) Eine Gruppe mit einer unterschwelligen Variante, d.h. alle Symptome, ausser der Rigidität sind vorhanden, eine Vererbung liegt ebenfalls vor. Auslösende Agenzien sind wahrscheinlich weniger wirksame Medikamente.

b) Eine zweite Gruppe der nichtrigiden Form stellt die nichtvererbte MH dar. Mitbedingender Faktor ist hier möglicherweise ein zu geringer $Mg^{++}$ - Spiegel im Körper.

Zu diesem klinischen Bild gehört eine Reihe weiterer pathologischer Veränderungen in allen Organen, insbesondere aber im Blut, Gehirn, in der Muskulatur und Niere.

Mit der Temperaturerhöhung steigt der $O_2$ - Verbrauch stark an, parallel dazu nimmt die $CO_2$ - Produktion zu. Bei der Blutgasanalyse zeigen sich Werte von $pO_2$ = 58 mmHg, $pCO_2$ = 75 mmHg, ein pH von etwa 7,0 mit einem BE von -13 (88).

Laborchemisch können eine metabolische Azidose, Hyperkaliämie, Hyponatriämie, Hyperphosphatämie und Glukosestoffwechselstörungen (10,51) während eines MHS im Serum nachgewiesen werden (Abb. 22.1).

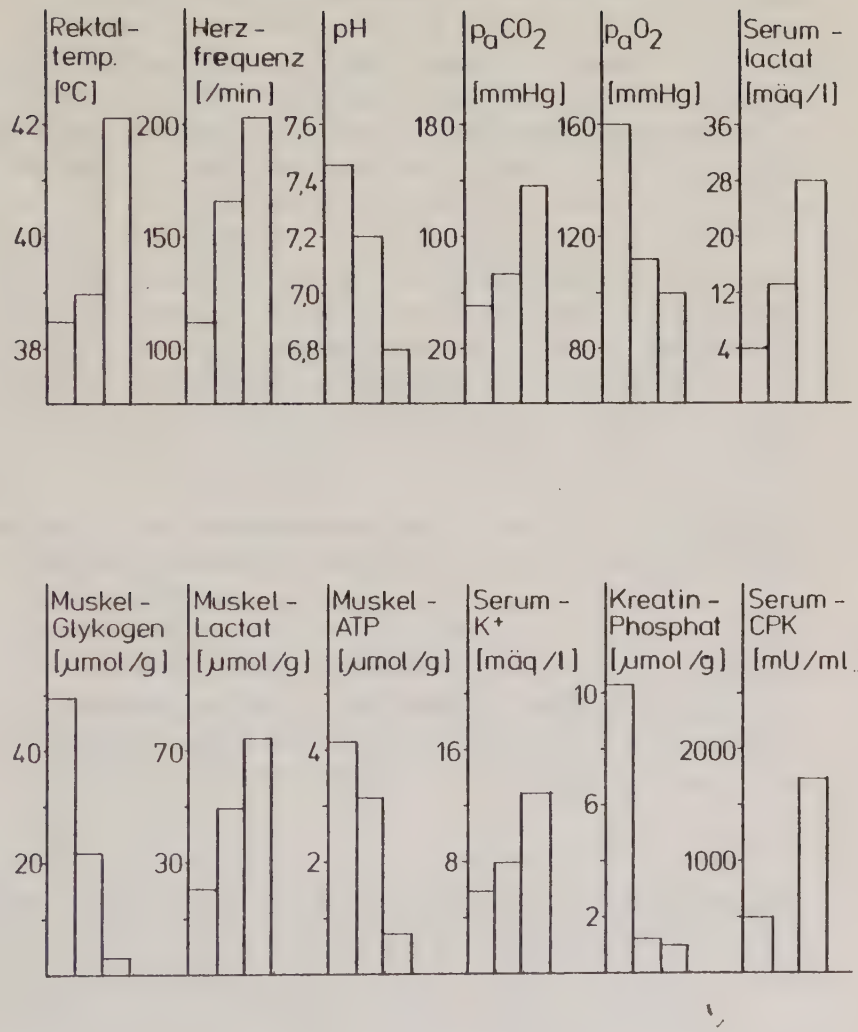


Abb. 22.1. Änderungen wichtiger Werte während einer MH - Krise. Säule 1 : Wert vor Verabreichung
Säule 2 : Wert bei Beginn des Rigors
Säule 3 : Endwert
Die Werte wurden an Schweinen gemessen (71,99)

Auch bestimmte Enzyme sind verändert und erlauben so einen Rückschluss auf den Ort der Störung.

SGOT, SGPT und LDH sind nicht bis mässig, die muskelspezifische CPK dagegen sehr stark bis über 3 000 U/l (Norm 60 U/l) und ohne Ausnahme erhöht. Anhand des CPK/GOT - Quotienten muss angenommen werden, dass diese Enzyme aus der geschädigten Skelettmuskulatur stammen (155).

Dass dieser Anstieg nicht durch Muskeltraumen, auch während der Operation, ausgelöst werden kann, sondern ein MH - spezifisches Sympton ist, zeigten ZINGANELL et al. durch prä - und postoperative CPK - Messungen an gesunden Patienten mit Werten von etwa 40 U/l vor und 160 U/l nach der Operation (155).

Weitere Symptome einer manifesten MH sind oftmals eine Verbrauchskoagulopathie (21,46) mit anschliessenden Blutungen, Hirnödemen (Coma), eine Myoglobinurie (der Verlust kann einer Muskelmasse bis zu 2 kg entsprechen (116) und einem sekundärem Nierenversagen (10). Im Muskel selbst kommt es zu akuten Muskelfasernekrosen und elektromyographisch verifizierbaren Abnormitäten, die dem Befund einer latenten Myopathie ähnlich sind (56).

Therapeutische Massnahmen

Folgende Massnahmen sind nach einem MHS durchzuführen, modofiziert nach BRITT (154) und KORTEN (88):

- auslösendes Agens sofort absetzen
- reinen Sauerstoff atmen lassen
- Pufferung des Blut - pH
- Gabe von Procain (es fördert die Bindung von $Ca^{++}$ an das sarkoplasmatische Retikulum (36,73) )
- anstelle von Proccain wird gegenwärtig die Verabreichung von Dantrolen versucht. ( Nach Untersuchungen

von GRONERT et al. (63) konnte durch eine Infusion mit Dantrolen, zusätzlich zu den anderen hier genannten Massnahmen, eine dramatische Besserung des Zustandes erreicht werden. Die Temperatur fiel ab, $O_2$ - Verbrauch, Laktat, $K^+$ und Katecholamine normalisieren sich, während in einer Vergleichsgruppe ohne Dantrolen der Verlauf nur unwesentlich beeinflusst wurde.
Entscheidend für die Wirkung des Medikaments dürfte sein Einfluss auf die intrazelluläre $Ca^{++}$ - Verschiebung sein. Es hemmt die Freisetzung von $Ca^{++}$ in der Zelle, ohne jedoch die $Ca^{++}$ - Rückresorption zu verhindern).

- Korrektur der Elektrolytstoffwechselstörungen
- Gerinnungsstörungen mit Heparin und Thrombozyten verhindern

Neben diesen Massnahmen muss sofort nach der MH - Diagnose mit allen zur Verfügung stehenden Mitteln gekühlt werden:

- Körperoberfläche mit Eis bedecken
- alle Infusionen eisgekühlt infundieren
- Spülung des Magens und Darmes mit Eiswasser, notfalls auch Peritonaeum mit Eiswasser spülen (60)
- Vasodilatatoren verabreichen (117)

Prognose

Prognostisch günstig ist eine schnelle Erkennung des MHS. Wurde innerhalb 15 Minuten die richtige Diagnose gestellt - und richtig therapiert -, so überlebten bisher alle Patienten (21,88).

Die Überlebensrate sinkt jedoch sehr rasch mit steigender Temperatur; bei 39,4 $^{o}C$ noch 100 % betragend, fällt sie mit 41,7 $^{o}C$ auf nur noch 18 % ab (116).

Andere Autoren vermuten weiterhin eine Abhängigkeit von der zugeführten Dosis an MH - auslösenden Agenzien und dem Degenerationsgrad der Muskulatur (156).

Prophylaktische Massnahmen

Ausgehend von der Vererblichkeit der MH sollte jeder Patient mit vorgesehener Allgemeinanaesthesie präoperativ nach Vorfällen befragt werden, die in der Familie, bei Verwandten oder dem Patienten selber aufgetreten sind und in ihrer Symptomatik dem Krankheitsbild der MH gleichen.

Ebenso sollte nach muskuloskelettären Abnormitäten gesucht werden, da diese ja oft bei einem potentiellen MH - Patienten vorliegen.

Günstiger als diese Befragungen wären Untersuchungen, die objektivierbar und gleichzeitig als Screening - Methoden verwendbar sind.

In dieser Richtung gibt es mehrere Versuche, die aber leider entweder für den Patienten eine zu grosse Belastung darstellen oder aber andererseits zu unsicher sind.

Wie die obigen Ausführungen zeigen, liegt die Ursache der MH allem Anschein nach in der Muskulatur und es lag nahe, das muskelspezifische Enzym CPK als Parameter für eine MH - Gefährdung heranzuziehen.

Wie schon ZINGANELL zeigte, kommt es nach einer durchgemachten MH zu einem ausserordentlichen starken CPK - Anstieg im Serum. Es erhebt sich die Frage, ob schon präoperativ eine CPK - Erhöhung zu finden ist.

Diese Untersuchungen wurden auch von vielen Autoren durchgeführt, allerdings mit unterschiedlichsten Ergebnissen.

Die Serum - CPK - Werte waren in Familien mit MH - Fällen zwar häufig erhöht (12,75), andererseits schliesst eine normale CPK - Aktivität einen MH - Zwischenfall nicht aus (53,126).

Weiterhin sind die SCPK - Werte einer Person zu verschiedenen Zeiten sehr unterschiedlich (54) und werden durch Traumen derart verfälscht, dass eine zuverlässige Vorhersage nicht möglich ist.

WHITBY sieht die Voraussetzungen für einen allgemeinen CPK - Screening - Test auch deshalb nicht gegeben, weil die Häufigkeit des MHS zu gering ist, um einen derartigen personellen und finanziellen Aufwand zu rechtfertigen (149).

Versuche wurden auch mit Hilfe der CPK - Isoenzyme (MM,MB, BB) durchgeführt.

ZSIGMOND et al. will anhand erhöhter Serum - CPK - Werte und mit BB - dominierendem Isoenzym (normal MM - Isonzym prädominant) MH - gefährdete Personen identifizieren (156).

Andere Autoren stimmen mit ihren Ergebnissen bezüglich der Serum - CPK - Erhöhung zwar überein, widerlegen jedoch die BB - Dominanz und zeigen nur eine starke MM - Erhöhung ohne BB - Aktivität (119).

Auch das von ZSIGMOND als erhöht betrachtete Verhältnis BB : MB wird von SCHMIDT et al. im normgerechten Verhältnis gefunden (132).

Die bisher beste, aber auch aufwendigste und tiefgreifendste Methode für die MH - Früherkennung ist wohl die Muskelbiopsie (22,25).

Mit Hilfe dieser Proben kann man durch in vitro Versuche mit Halothan eine Kontrakutur erzeugen. Diese zeigt sich

nur bei histologisch nachgewiesenen Myopathien mit häufig auch erhöhten CPK - Werten (51).

Eine Bestimmung des $Ca^{++}$ - Gehaltes der Biopsien erscheint trotz signifikant geringeren Gehaltes der MH - Muskulatur nicht sinnvoll, da die Streuung der einzelnen Werte zu gross ist (24).

Erscheinen die Risiken einer Allgemeinanaesthesie trotz allem zu gross, so können andere Narkoseformen gewählt werden, z.B. die von BRITT vorgeschlagene Lokal-, Regional- oder Leitungsanaesthesie (Epidural- bzw. Spinalanaesthesie) (22).

Die Epiduralanaesthesie scheint nicht nur keine MH auszulösen, sondern verhindert auch die Manifestation der MH - Symptome in den relaxierten Extremitäten nach Halothan - Anaesthesie (82).

In gleicher Weise wirkt die Stauung einer Extremität, auch hier ist keine Rigidität der jeweiligen Extremität zu beobachten, obwohl der übrige Körper Zeichen der MH zeigt (68).

Eine weitere Narkoseform, die von ZINGANELL als MH - sicher betrachtet wird, ist die Neuroleptanalgesie, die allerdings ohne Muskelrelaxantien durchgeführt werden muss (155).

Pathophysiologie

Noch weitgehend unklar sind auch die pathophysiologischen und biochemischen Vorgänge der MH.

Wenn auch von machen Autoren eine zentrale, oder zumindest eine neuronale Beteiligung für möglich gehalten wird (68,116) (kein Rigor in durch Epiduralanaesthesie relaxierter Muskulatur (82); Erhöhung des nervenspezifischen CPK - BB - Isoenzyms (20), so scheint der grundlegende Mechanismus für das

Auftreten eines MHS doch eine Alteration der $Ca^{++}$ - speichernden Membranen in der Muskelzelle zu sein (10,110).

BRITT et al. (27) zeigte, dass durch Halothan die $Ca^{++}$ - Speicherkapazität im sarkoplasmatischen Retikulum vermindert wird. Ob dies nun durch direkten Angriff an der Membran - FURNISS denkt an eine Umwandlung der bilaminaren in eine micelläre Phase (58) -, oder über einen indirekten Wirkungsmechanismus erfolgt ist unklar.

Ungewiss ist weiterhin, ob nur diese oder auch weitere Membranen verändert sind. Einige Autoren diskutieren einen generalisierten Membrandefekt aller Zellorganellen der Muskulatur (21,76), möglicherweise sogar aller Zellen, wie er insbesondere von HARRISON et al. schon an Erythrozyten von MH-sensiblen Schweinen nachgewiesen wurde (69).

In jedem Falle kommt es durch das MH - auslösende Agens zu einer exzessiven $Ca^{++}$ - Ausschüttung aus den physiologischen $Ca^{++}$ - Speichern (10).

Die Skellettmuskulatur ist somit der Ort der primären Schädigung; unterstützt wird diese Vermutung durch das klinische Bild, das sich auch vorwiegend in Symptomen äussert, die primär, bzw. sekundär auf eine Muskelzellschädigung zurückzuführen sind, sowie auch durch Vergleiche des $O_2$ - Verbrauches zwischen Muskel und anderen Organen (64).

Abb. 28.1 zeigt schematisch die Entstehung des wichtigsten und charakteristischsten Symptoms der MH, die ihr auch den Namen gab, die Wärme.

Aus diesem Schema lassen sich alle weiteren Veränderungen ableiten, die bei der Beschreibung des klinischen Bildes gezeigt wurden.

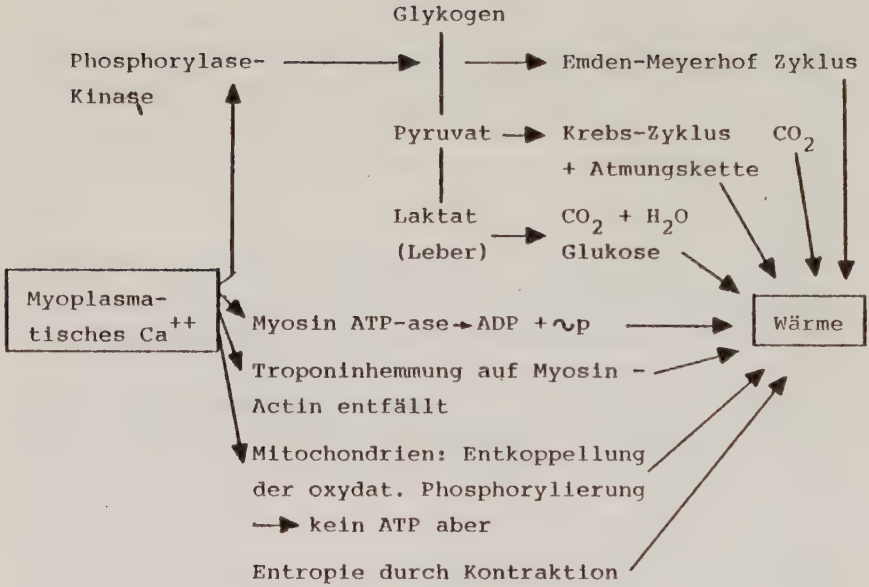


Abb. 28.1. Schematische Darstellung der pathogenetischen biochemischen Vorgänge bei MH unter Annahme einer Vermehrung des myoplasmatischen $Ca^{++}$. Nach BERNHARDT und SCHILLER (12)

In der normalen Muskelzelle wird $Ca^{++}$ durch ein Aktionspotential aus dem sarkoplasmatischen Retikulum freigesetzt, es kommt zur Kontraktion. Da es jedoch nicht mehr in genügendem Masse rückresorbiert wird, verbleibt es im Sarkoplasma und führt über die unten beschriebenen Mechanismen zur exzessiven Wärmeproduktion.

Da ist zunächst die Phosphorylase - Kinase - Stimulation. Dieses Protein ist ein sogenanntes Kontrollenzym, das die Glykogenolyse stimuliert.

Es erfolgt somit ein verstärkter Glukoseabbau, der aerob über den Metaboliten Pyruvat in den Zitronensäurezyklus und die Atmungskette einmündet, unter Bildung von ATP, $CO_2$ und Wärme. Dieser Weg stellt in der Initialphase den überwiegenden Wärmeproduzenten dar (65).

Reicht die Sauerstoffversorgung nicht mehr zur Oxydation des Pyruvats aus, dominiert die Glykolyse (Embden - Meyerhof - Weg), wobei Laktat das Endprodukt darstellt. Dieses wird nach dem Transport in die Leber entweder zur Glukoneogenese verwendet oder, unter Verbrauch von $O_2$, zu $CO_2$ und $H_2O$ oxydiert. Dabei entsteht $CO_2$ und Wärme.

Infolge der Stimulation des Zitronensäurezyklus durch Pyruvat wird erhöht $NADH+H^+$ gebildet, das vermehrt in der Atmungskette oxydiert wird. Die Folge: starker $O_2$ - Verbrauch, Bildung von $H_2O$. Auch hier fällt wieder Wärme an.

Über die Aufhebung der Troponin - Hemmung wird die Myosin - ATPase aktiviert, der Muskel kontrahiert sich, ATP wird hydrolysiert zu ADP + Phosphat, weiterhin entsteht: Wärme.

$Ca^{++}$ gelangt in die Mitochondrien und bewirkt hier eine Entkopplung der oxydativen Phosphorylierung von der Atmungskette, es kommt zur chemischen Thermogenese (P/O -Quotient wird Null). Das hat zur Folge, dass in der Atmungskette kein ATP mehr gebildet wird, die anderen Prozesse ($CO_2$-, $H_2O$-, Wärme - Bildung) aber mit maximalem Durchsatz arbeiten.

Betrachtet man unter diesen Umständen die ATP - Konzentration, so ist im Initialstadium der MH kaum eine Änderung festzustellen. Gleichzeitig nehmen aber Kreatinphosphat und Muskelglykogen stark ab, das Serum - Laktat nimmt zu, das bedeutet: ATP wird aus der Glykolyse und aus dem vorhandenen Kreatinphosphat gewonnen (Abb. 21.1.)

Im weiteren Krankheitsverlauf fällt schliesslich das intrazelluläre ATP drastisch ab, gefolgt von einem gleichzeitigen Anstieg des ADP (58,76).

Die universelle Energiequelle des Körpers, ATP, wird im Muskel nicht mehr in genügendem Masse bereitgestellt, alle aktiven Transportvorgänge fallen aus, das ins Sarkoplasma eingeströmte $Ca^{++}$ kann nicht mehr aktiv in die Cisternen rückresorbiert werden, stimuliert also in verstärktem Masse die oben beschriebenen Vorgänge. Der circulus vitiosus ist perfekt (20).

Mit der dadurch erhöhten Membranpermeabilität finden viele der oben genannten MH - Symptome eine folgerichtige Erklärung.

Enzyme (CPK, GOT, GPT, LDH usw.) können ins Serum übertreten, ebenso durchdringen Myoglobin, Ionen und Moleküle die Zellgrenzen, abhängig vom Konzentrationsgradienten, in Richtung intra-, bzw. extrazellulären Raum.

Es kommt zu Hyperkaliämie, Hyperphosphatämie (Phosphat aus hydrolysiertem ATP), Hyperglykämie, Myoglobinämie usw., die ihrerseits wieder weitere Störungen auslösen.

Ob die Herzrhythmusstörungen nur sekundärer Natur sind, oder ob hier dieselben pathologischen Veränderungen wie in der Skelettmuskulatur auftreten, wurde bisher nicht genauer untersucht.

Doch schon der erhöhte $O_2$ - Verbrauch und die $CO_2$ - Mehrproduktion erfordern ein erhöhtes Atemminutenvolumen mit Tachykardie, dies umso mehr, als durch die Laktatbildung eine metabolicsche Azidose entsteht,die ebenfalls eine verstärkte Atmung bewirkt.

Ein weiterer Angriff auf das Herz entsteht durch die Hyperkaliämie und anschliessende Hypokaliämie, die zur Bradykardie und schliesslich zu Extrasystolen führt.

In Anbetracht aller dieser pathologischen Veränderungen nimmt die Membranstörung zwar eine zentrale Stellung ein, es bleibt jedoch weiterhin unklar, ob diese abnormen Membranstrukturen Folge oder Ursache der massiven Muskelstoffwechselstörung darstellten (10,12,63).

Auch BRITT et al. ziehen Faktoren wie pH, Temperatur oder ATP - Mangel als primäre Ursache mit in Betracht (23).

Vorstellungen der Tübinger Autoren zur Entstehung der MH

Auch die Tübinger Autorengruppen um SCHMITT (132) und JUNGER (77) sind der Ansicht, dass die auf den vorhergehenden Seiten beschriebenen pathophysiologischen Vorgänge zum klinischen Vollbild der MH führen, dass also durch die fehlende bzw. ungenügende $Ca^{++}$ - Rückresorption aus dem Sarkoplasma in die Cisternen die genannten pathologischen Werte induziert werden und bei nicht rechtzeitigen Gegenmassnahmen zum Tode führen.

Da den oben genannten Autoren die wichtige Tatsache der erblichen Belastung der MH bekannt war, untersuchten sie die nahen Angehörigen (Eltern und Geschwister). Sie interessierten sich dabei hauptsächlich für die CPK und AK Werte.

Hinsichtlich der CPK - Werte fanden sie bei keinem der Verwandten weder in der Skelettmuskulatur noch im Blut pathologische Veränderungen. Auch eine Verschiebung des BB : MB - Verhältnisses liess sich nicht nachweisen, wie dies unter anderem von den Gruppen um ZSIGMOND (156), PETER (119), DENBOROUGH (47) und ISAACS (75,76) beschrieben wurde.

Aktivität von 10 - 20 % der Norm gefunden, während sie bei Vater und Bruder im Normbereich lag.

Die AK der Erythrozyten zeigte bei keinem der Verwandten einen Aktivitätsabfall, sodass von der Gruppe SCHMITT eine separate genetische Kontrolle für die Erythrozyten - AK vermutet wird.

Da die AK die ATP - Konzentration relativ konstant hält, bei MH jedoch ein stark erniedrigter ATP - Pegel gefunden wird, sehen die Tübinger Autorengruppen im AK - Mangel die Ursache für die MH. Infolge des AK -Mangels ist die Zelle nicht mehr in der Lage, den erniedrigten ATP- Spiegel schnell genug zu regenerieren und damit die lebenswichtige $Ca^{++}$ - Rückresorption zu garantieren.

Während die Gruppe SCHMITT (132) jedoch die Ursache für MH in einer zu geringen AK - Aktivität sieht, die genetisch bedingt ist und schon präanaesthetisch vorliegt, geht JUNGER (77) noch einen Schritt weiter und vertritt die Meinung einer AK - Inaktivierung bei MH - sensiblen Menschen während der Narkose, bzw. während der Gabe des MH - triggernden Agenzes.

In ihren in vitro Versuchen stellten sie dann auch tatsächlich eine Aktivitätsminderung der AK fest, die, abhängig vom Anaesthetikum, zwischen 80 % (Halothan) und 55 % (Enfluran) lag.

In der vorliegenden Arbeit soll nun versucht werden, anhand von in vivo Experimenten die von den oben genannten beiden Tübinger Autorengruppen aufgestellte Hypothese einer AK - Defiziens bei MH - Patienten weiter zu untermauern.

# 3. Material und Methoden

Die durchgeführten Experimente dieser Arbeit gliedern sich in zwei Teile: die Gewinnung der Organproben und, nach zwischenzeitlicher Lagerung, die Aufarbeitung (Bestimmung der Aktivität) derselben.

Zur Wahrung der Übersicht wurde deshalb auch der Teil " Material und Methoden " nochmals in je zwei Teile gegliedert.

## 3.1. Untersuchungsmaterial

### 3.1.1. Tiermaterial

Als Tiere für die vorliegende Untersuchung wurden Schweine gewählt. Zum einen, weil zufallsbedingt eine ausreichende Anzahl zur Verfügung stand, zum anderen, und das war das Entscheidende, weil gerade bestimmte Schweinerassen für MH besonders anfällig sind (26,62,67,98).

Ob allerdings die von uns untersuchten Schweine, sogenannte Göttinger Miniaturschweine, zu diesen MH - empfindlichen Rassen zu zählen sind, muss unbeantwortet bleiben, da in der Literatur keine Hinweise darauf zu finden waren.

Die Schweine waren im Versuchstierstall der chirurgischen Universitätsklinik in Tübingen untergebracht und sind, wenn man von der Grösse und dem geringeren Gewicht absieht, im Aussehen etwa dem Deutschen Hausschwein vergleichbar.

Die ausgewählten 8 Schweine wogen zwischen 20 kg und 80 kg. Das Alter des 20 kg - Schweines betrug etwa 6 Monate, das der übrigen etwa 18 Monate.

Die Tiere wurden in zwei Gruppen geteilt (je 4 Schweine) und von 1 - 4, bzw. 6 - 9 nummeriert. Diejenigen mit den Nummern 1,2,3,4 erhielten später eine Halothan - Narkose, die Tiere der zweiten Gruppe mit den Nummern 6,7,8 und 9 eine Rohypnol - Narkose.

Weitere Einzelheiten gehen aus der Tabelle im Teil 3.2.1. hervor.

3.1.1.1. Geräte zur Probeentnahme

Zur Entnahme der Proben wurden ausser einer Spezialzange, auf die unten noch genauer eingegangen wird, die in einem OP üblichen Geräte und Instrumente verwendet.

Bei der Halothan - Narkose wurde ein halboffenes System benutzt, wobei als Maske ein Schlauch mit einem Durchmesser von 20 cm diente, der auf der einen Seite an den vom Narkoseapparat kommenden Schlauch angeschlossen war, mit der anderen Seite so über den Rüssel des Schweines geschoben werden konnte, dass Nasenöffnungen und Mund vollständig überdeckt waren und damit der Halothan - Dampf beim Einatmen nicht entweichen konnte.

Bei der Rohypnol - Anaesthesie wurde kein Apparat benötigt.

Die Proben wurden je nach Art des Organs über verschiedene Gefässe verteilt.

Das Blut wurde in Reagenzgläser aus Glas gefüllt (32), die Portionen von Leber und Muskel fanden in für diesen Zweck präparierten Urinbechern Platz (Abb. 35.1.).

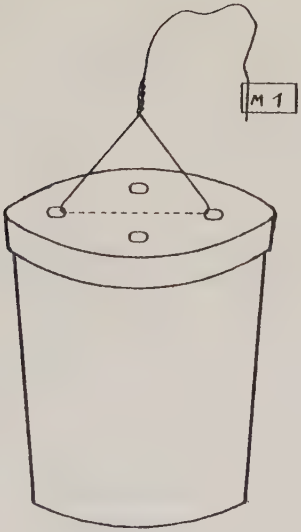


Abb. 35.1 Behälter für Leber- und Muskelportionen

Als Behälter für die Aufbewahrung der Proben in flüssiger Luft wurden Dewar - Gefässe verwendet. Sie garantierten, dass die eingefüllte flüssige Luft gegen Wärmezufuhr von aussen geschützt und damit eine zu schnelle Verflüchtigung verhindert wurde.

Zur Gewebeentnahme von Leber und Muskel dienten zwei Gefrierstoppzangen. Sie wurden nach der Beschreibung von WOLLENBERGER (152) mit einigen spezifischen Änderungen für die Versuche angefertigt (Abb. 36.1).

Um eine konstante Dicke der einzelnen Proben zu gewährleisten, wurde eine Stellschraube angebracht, damit konnte der Probendurchmesser von theoretisch 0 cm bis etwa 3 cm eingestellt werden .

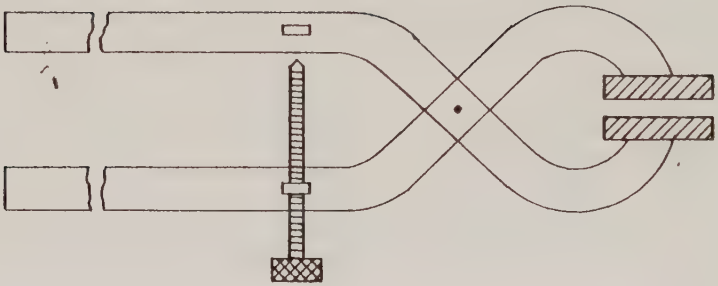

Abb. 36.1. Gefrierstoppzange zum Entnehmen der Proben

Bei der Abschätzung der Abkühlungszeit, die mit dieser Zange erreicht werden kann, wurde eine Näherungsformel benutzt (152).

Dabei gilt für einen $38^{O}$ C warmen Muskel, der von einer mit flüssiger Luft ($-193^{O}$ C) gekühlten Zange gefriergestoppt wird, folgende Gleichung (Gl. 36.1.) für die Zeit bis zum Erreichen einer bestimmten Temperatur:

$$t = \frac{L \; d^2}{K^2 \; \pi^2} \qquad \text{(Gl. 36.1.)}$$

L = Ist eine aus einer Graphik zu entnehmende Zahl

d = Ist die Dicke der Probe in cm

K = Ist die Temperaturleitzahl; für Muskulatur ist $K = 0{,}05 \text{ cm}^2/\text{s}$

Somit ergeben sich mit den vorliegenden Verhältnissen Abkühlungszeiten von:

$t_{273}$ = 0,64 s (Abkühlung auf $0^{o}$ C)

$t_{253}$ = 0,8 s (Abkühlung auf $-20^{o}$ C)

3.1.1.2. Chemikalien zur Probeentnahme

Flüssige Luft (Siedepunkt $80^{o}$K ($-193^{o}$ C) ) wurde zur Aufbewahrung und Kühlung bestimmter Proben verwendet.

3,8 % - ige Natriumzitratlösung nach Westergren diente der Verhinderung der Blutgerinnung.

Mit Ketanest (R), hergestellt von Parke Davis, München, wurde die Narkose eingeleitet. Es ist ein Ketamin und dient als Injektionsnarkotikum. Es kann als Monoanaesthetikum für diagnostische Massnahmen wie auch als Prämedikation zur Einleitung von Allgemeinnarkosen verwendet werden.

Für die Allgemeinnarkose wurde einmal das zu untersuchende Narkotikum Halothan eingesetzt. Dieses Narkotikum ist sehr gut steuerbar und nicht explosiv, wie z.B. Äther. Dies hat dazu geführt, dass Halothan das am meisten verwendete Inhalationsnarkotikum der Gegenwart ist. Allerdings ist die analgetische und muskelrelaxierende Komponente schlecht, es müssen deshalb noch weitere Mittel gegeben werden.

Chemisch steht Halothan dem Chloroform nahe (halogenierter Kohlenwasserstoff). Es enthält ausser Chlor noch Fluor und Brom als weitere Halogene (Abb. 37.1.).

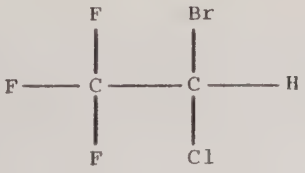


Abb. 37.1. Strukturformel des Halothan (1,1,1 - Trifluor - 2 - brom - 2 - chloräthan

Halothan wird relativ schnell in der Lunge resorbiert. Der Löslichkeitskoeffizient (Blutkonz.: Atemgaskonz.) beträgt 2,3, im Vergleich zu Äther mit 12. D.h., mit Halothan ist eine 2,3-fach höhere Blutkonzentration gegenüber dem Atemgas wesentlich schneller erreicht, als mit Äther, wo eine 12-fach höhere Konzentration erforderlich ist.

Andererseits hat $N_2O$ einen Koeffizienten von nur 0,47, womit eine wesentlich bessere Steuerung möglich ist. Halothan besitzt also einen mittleren Koeffizienten und nur infolge seiner hohen klinischen Potenz wird eine unerwartet gute und schnelle Wirkung erreicht.

Zu Beginn der Narkose nimmt der Mensch (KG 70 kg) etwa 200 ml/min Dampf auf, nach wenigen Minuten sinkt jedoch der Anfangsverbrauch schon ab. Nach etwa 60 Minuten werden pro 1 % Dampfkonzentration nur noch etwa 15 ml/min Dampf resorbiert.

Die obigen Betrachtungen gelten, solange man den Körper als homogen ansieht, misst man jedoch die Konzentrationen in den einzelnen Geweben, so variieren sie sehr stark. (Abb. 39.1.). Der Zeitpunkt der Gleichgewichtseinstellung ist also vom Gewebe abhängig.

Beim Blut, Gehirn, dem Muskel und der Leber schwanken die Werte zwischen 20 min (Blut) und 1 h (Gehirn). Beim Fett hingegen würde der endgültige steady - state - Zustand erst nach 50 Stunden erreicht sein.

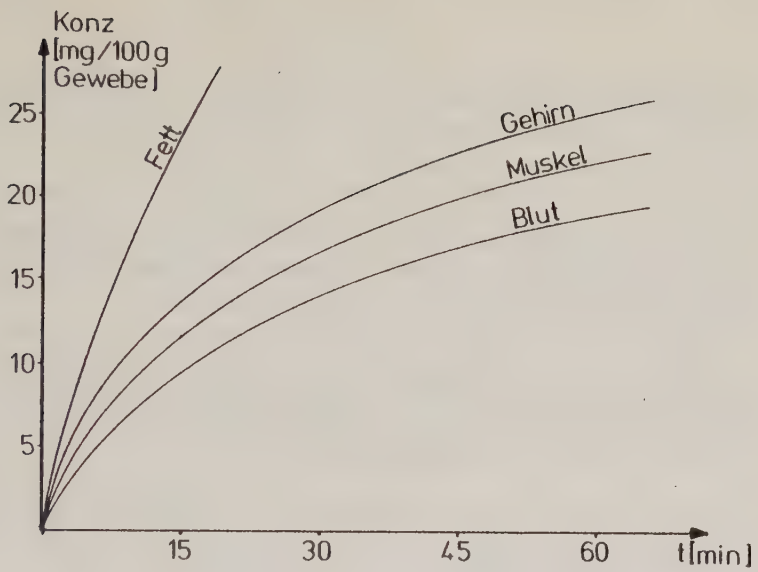


Abb. 39.1. Halothankonzentrationen in den einzelnen Geweben (50)

Die Konzentrationen im Gleichgewichtszustand sind für Blut: 20 mg/100 g, Leber (Muskel): 40 mg/100 g, Fett: 1 000 mg/100 g.

Nach Unterbrechung der Narkose erfolgt eine schnelle Abflutung aus dem Gehirn, der Patient erwacht je nach Dauer der Narkose, 5 - 45 Minuten nach dem Absetzen.

Die Konzentration in den einzelnen Geweben sinkt dabei in umgekehrter Reihenfolge wie beim Anstieg beschrieben.

Insgesamt werden 85 % des aufgenommenen Halothans exhaliert und etwa 15 % verstoffwechselt (137).

Über die pharmakodynamische Wirkung ist bisher sehr wenig bekannt, deshalb sind alle Theorien bezüglich des Wirkungsmechanismus als spekulativ anzusehen.

Das zweite verwendete Anaesthetikum ist ein sich noch nicht auf dem Markt befindendes Mittel, da es sich noch in der klinischen Erprobung befindet.

Es handelt sich hierbei um das Präparat Rohypnol, mit der vorläufigen Bezeichnung Ro 5 - 4 200, hergestellt von der Firma Hoffmann - La Roche & Co, A.G., Basel.

Rohypnol ist ein Benzodiazepinderivat, zählt also zu den Tranquilizern, wie auch z.B. Diazpam (Valium(R)). Strukturell steht es dem Nitrazepam (Mogadan(R)) sehr nahe (Abb.40.1.).

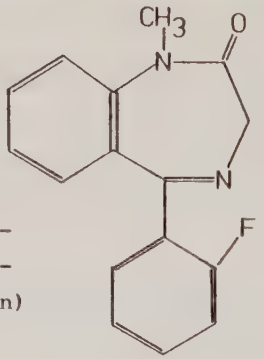


Abb. 40.1. Strukturformel des Rohypnol (5 - (o - Fluorphenyl) - 1,3 - dihydro - 1 - methyl - 7 - nitro - 2H - 1,4 - benzodiazepin - 2 - on)

Das Präparat ist sehr stark schlafinduzierend, daraus wurde die Möglichkeit einer Verwendung als Hypnotikum abgeleitet, das in der Anaesthesie als Narkose - Indukuktions - Wirkstoff eingesetzt werden konnte.

Eine analgetische Komponente fehlt, sodass auch hier, wie bei Halothan, mit einem weiteren Schmerzmittel kombiniert werden muss.

Rohypnol wird zur Narkose intravenös verabreicht. Die Dosis liegt bei etwa 0,03 mg/kg Körpergewicht.

Mit dieser Menge schläft der Patient nach 60 - 120 s ein, d.h., im Gehirn wird über einen Zeitraum von etwa 30 min

eine Konzentration erreicht, die zur Schlafinduktion ausreicht.

Da Rohypnol intravenös injiziert wird, erfolgt im Blut eine schnelle Verteilung. Das Blut ist jedoch nur ein Teil des zentralen Kompartimentes, da dieses zu 80 % des Körpergewichts berechnet wurde. Damit muss auch die Muskelmasse zumindest teilweise zum zentralen Kompartiment gehören. Das bedeutet, dass nach einer bestimmten Zeit die Konzentrationen im Muskel und Blut annähernd gleich sein müssen. Dies ist auch nach etwa einer Stunde zu messen.

Innerhalb der ersten Stunde steigen die Konzentrationen in allen Geweben, während im Blut ein exponentieller Abfall zu verzeichnen ist (Abb. 41.1.).

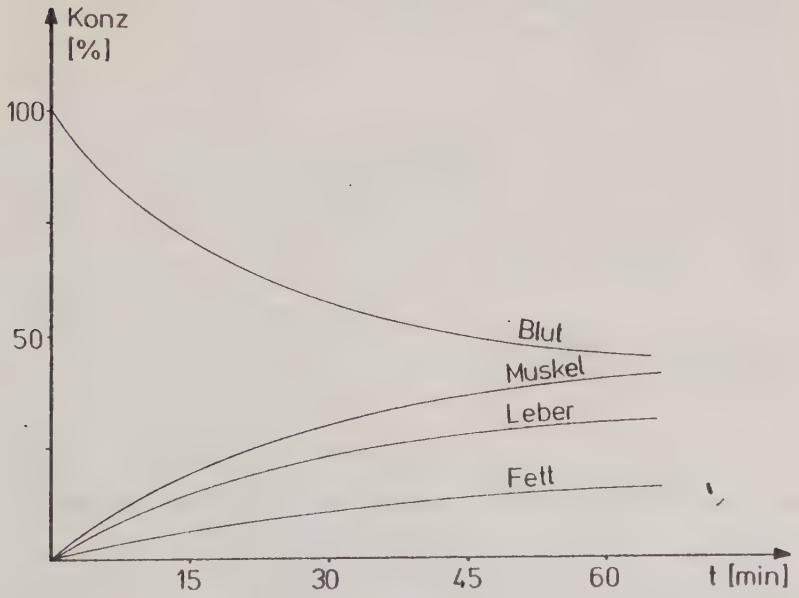


Abb. 41.1. Rohypnolkonzentrationen in verschiedenen Geweben

Die Muskulatur erreicht das Konzentrationsmaximum nach ca. einer Stunde mit etwa 30 % der gesamten injizierten Menge, während die lipophilere Leber nach etwa 2,5 Stunden mit einer geringfügig höheren Konzentration das Maximum erreicht.

Im Fett, dem lipophilsten Kompartiment, muss dagegen bei einmaliger Injektion mit 6 - 7 Stunden gerechnet werden, um die höchste Konzentration (35 % - 40 %) zu erreichen.

### 3.1.2. Organproben

Um die Möglichkeit einer gezielten und sorgfältigen Probenentnahme zu wahren, beschränkten wir uns auf drei Organe:

a) die geformten Bestandteile des Blutes, also vorwiegend die Erythrozyten,
b) die Leber,
c) den Muskel.

Mit dieser Auswahl war gleichzeitig gewährleistet, dass auch Adenylatkinase aus verschiedenen Sets gewonnen wurde, und damit ein unterschiedliches Verhalten dieser Sets erkannt werden konnte (83).

Entscheidend für die Wahl von Muskel war die grosse Wahrscheinlichkeit, mit der das Hauptgeschehen der MH in diesem Gewebe abläuft.

Das Blut wurde auch im Hinblick auf einen später eventuell möglichen MH - Screening - Test gewählt, da dieses am einfachsten zu entnehmen ist und in jeder Klinik ja doch routinemässig zur Kontrolle anderer Parameter gebraucht wird.

Die Menge des entnommenen venösen Blutes betrug 20 ml pro Schwein, davon blieben nach dem Waschen noch etwa 9 ml übrig.

Von der Leber wurden zwei etwa gleich grosse Portionen zu je 5 g mit der Gefrierstoppzange entnommen und in den oben beschriebenen Bechern in flüssiger Luft aufbewahrt.

Die Muskelproben wurden analog den Leberproben aufgeteilt und aufbewahrt.

3.1.2.1. Geräte zur Verarbeitung der Proben

Als Zentrifuge wurde die Cryofuge 6 - 6 der Firma Heraeus Christ, Osterode verwendet.

Die Extinktion wurde mit einem Photometer, Modell PM - 4, von der Firma Zeiss, Oberkochen, bestimmt.

Dieses Gerät besitzt eine Küvettenautomatik, sowie einen linearen Potentiometerschreiber, mit dem die Extinktion aller Küvetten fortlaufend graphisch aufgezeichnet werden kann.

3.1.2.2. Chemikalien zur Aufarbeitung der Proben

Bei der Aufarbeitung der Proben wurden die folgenden Reagenzien von der Firma Merck, Darmstadt, bezogen:

Triäthanolamin
Glukose (wasserfrei, für biochemische Zwecke)
Kaliumchlorid
Magnesiumchlorid
Natriumhydrogenkarbonat

Alle Stoffe waren für analytische Zwecke geeignet.

An Enzymen und Nukleotiden wurden die folgenden, von der Firma Boehringer, Mannheim, bezogenen Biochemica verwendet:

- Adenosin - 5' - diphosphorsäure (ADP), als kristallisierte freie Säure

- Nicotinamid - adenin - dinucleotidphosphat (NADP), oxydierte Form
- Hexokinase aus Hefe (HK), spezif. Aktivität ca. 140 U/mg
- Glucose - 6 - phosphat - Dehydrogenase (G6P - DH), spezifische Aktivität ca. 550 U/mg
- Myokinase (MK), spezif. Aktivität ca. 360 U/mg

Zur Hämoglobin - Bestimmung wurde die "Testkombination Hämoglobin" ebenfalls von Boehringer, für die Eiweiss-Bestimmung die Biuret - Methode mit "Weichselbaums Reagenz" verwendet.

## 3.2. Methoden

### 3.2.1. Probenentnahme vom Tier

Um bei der Entnahme der Proben grösstmögliche Gleichmässigkeit zu erzielen, wurden die Tiere einer Gruppe (Rohypnol- und Halothangruppe) jeweils innerhalb weniger Stunden operiert.

Dadurch sollten Fehler ausgeschlossen werden, die durch die Tierhaltung mitbedingt sein konnten, wie z.B. andere Fütterung oder, da die Tiere auch im Freien waren, eine wetterbedingte Abhängigkeit.

Die Entnahme der Proben erfolgte bei beiden Gruppen grundsätzlich auf gleiche Weise.

Nur bei der Verabreichung der Narkotika musste, bedingt durch die verschiedenen Aggregatzustände derselben, bei der Aufnahme in den Körper eine unterschiedliche Methode angewandt werden.

Alle wichtigen Daten, wie Menge der Narkotika, Gewicht und Zeitpunkt der Probenentnahme gehen aus Tabelle 45.I. hervor.

Halothan - Gruppe

| Nr. | Gewicht | Ketanest(R) | | Halothan | | Zt. d. Probeentn. | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | (kg) | Menge (mg) | Zeit der Verabr. | Menge (%/mg) | Zeit der Verabr. | Blut | Leber | Musk. |
| 1 | 63 | 575 | 16.40 | 1-5 | 16.45 | 17.05 | 17.15 | 17.20 |
| 2 | 80 | 600 | 17.20 | 1-5 | 17.30 | 17.40 | 17.40 | 17.45 |
| 3 | 52 | 500 | 17.50 | 1-5 | 18.00 | 18.10 | 18.11 | 18.15 |
| 4 | 69 | 500 | 18.15 | 1-5 | 18.30 | 18.45 | 18.40 | 18.50 |
| | | | | Rohypnol - Gruppe | | | | |
| 6 | 20 | 500 | 15.20 | 4 | 15.30 | 15.45 | 15.45 | 15.50 |
| 7 | 67 | 650 | 16.35 | 4 | 16.40 | 16.45 | 16.50 | 17.00 |
| 8 | 63 | 650 | 17.10 | 6 | 17.35 | 17.40 | 17.45 | 17.45 |
| 9 | 71 | 850 | 18.00 | 4 | 18.15 | 18.20 | 18.25 | 18.30 |

Tabelle 45.I. Menge der verabreichten Medikamente, sowie Zeiten der Verabreichung und der Probeentnahme

Die Schweine erhielten zunächst zur Beruhigung eine i.m. Injektion in den muskulus glutaeus mit Ketanest (R). Wenig später konnten sie auf die Waage gehoben werden. Die anschliessende Lagerung erfolgte so, dass die Operateure im abdominalen Bereich ungehindert arbeiten konnten.

Das Rohypnol wurde vom Anaesthesisten über eine Ohrvene injiziert.

Die Einleitung der Halothan - Narkose erfolgte mit einem halboffenen System, wobei das $N_2O/O_2$ - Gemisch für die Dauer

von fünf Minuten eine Halothankonzentration von 5 % aufwies, die dann im weiteren Verlauf auf 1 - 2 % reduziert wurde.

Die Blutentnahme erfolgte mit einer 15 cm langen Kanüle aus der vena subclavia. Zur Verhinderung der Gerinnung wurden zwei Teile Blut mit einem Teil Natriumzitrat - Lösung gemischt und bis zum Entfernen des Plasmas in Reagenzgläsern bei einer Temperatur von 4 $^{o}$C aufbewahrt.

Zum Waschen wurden die Proben 10 min mit 2 000 g zentrifugiert und dann der Überstand abgesaugt. Die sedimentierten festen Blutbestandteile wurden anschliessend noch zweimal mit physiologischer Kochsalzlösung gemischt, zentrifugiert und nach der letzten Wäsche im Gefrierschrank bei -28 $^{o}$C eingefroren.

Mit dem Einfrieren wurde gleichzeitig erreicht, dass die Erythrozyten lysierten und so die AK freigesetzt werden konnte.

Zur Gewinnung der festen Proben fand die von BERGMEYER et al. als Methode der Wahl gefundene Gefrierstopptechnik Verwendung (11).

Etwa 10 - 15 Minuten nach Narkosebeginn wurde vom Sternum nach caudal ein ca. 30 cm langer Schnitt gelegt. Nach dem Spreizen der aufgetrennten Bauchdecke war die Leber leicht zugänglich. Um ein sofortiges Verbluten nach der Gewebeentnahme zu verhindern, wurde eine Leberklemme angelegt. Zwischenzeitlich waren die beiden Gefrierstoppzangen in flüssiger Luft abgekühlt worden, mit ihnen wurde jetzt das distal der Leberklemme liegende Gewebe auf 2 mm zwischen den Zangenbacken gequetscht und so eine schnelle Kühlung erreicht.

Die beiden Proben wurden dann in die mit flüssiger Luft ge-

gefüllten Urinbecher gelegt und so eine Wiedererwärmung verhindert. Sodann erfolgte das Einhängen der Becher aller Proben in flüssige Luft bis zur weiteren Verarbeitung.

Zur Entnahme der Muskelproben wurde, abgesehen von der etwas anderen Struktur des Muskels, analog der Leberentnahme vorgegangen.

Als Muskel diente die Muskelgruppe am hinteren medialen Oberschenkel. Nach Abpräparation der Haut wurde ein etwa 0,5 cm dicker und 5 cm breiter Muskelstreifen so abgelöst, dass er an beiden Enden noch mit dem übrigen Muskel verbunden war. Damit war gewährleistet, dass zumindest noch eine teilweise Versorgung mit Blut vorhanden blieb und damit der Metabolismus nicht schon vor der Entnahme vollständig unterbunden wurde.

Dieser Muskelstreifen wurde dann analog den Leberproben mit der gekühlten Zange gequetscht und im gekennzeichneten Becher aufbewahrt.

### 3.2.2. Aufarbeitung der Proben

Zur Bestimmung der Aktivität sind grundsätzlich zwei Möglichkeiten gegeben. Gemäss Gl.9.1. kann die Hinreaktion oder die Rückreaktion benutzt werden. Prinzipiell eignen sich beide Möglichkeiten zur routinemässigen Bestimmung, für die Verarbeitung und Messung sollten jedoch folgende Punkte erfüllt sein:

- Ergebnisse untereinander vergleichbar
- einfache, aber doch exakte Aktivitätsbestimmung
- die Aktivitätsbestimmung aller Proben sollte mit derselben Methode möglich sein
- auf Leber und Muskel gleichermassen anwendbare Aufschlussmethode

Mit der Aktivitätsmessung nach HELDT et al. (70) war eine einfache und genaue Aktivitätsbestimmung gegeben, es konnten alle drei Proben damit bestimmt werden, die Ergebnisse waren vergleichbar und damit die ersten drei Forderungen erfüllt.

Mit der anschliessend beschriebenen Methode der Homogenatgewinnung (modifiziert nach OLIVER (115), konnten Leber und Muskel auf gleiche Weise verarbeitet werden, Punkt vier war damit auch erfüllt.

Zellaufschluss

Zum Aufschluss der Zellen wurden die in flüssiger Luft gelagerten Proben zunächst in einem ebenfalls mit flüssiger Luft gefüllten Mörser soweit zerrieben, bis sich eine mehlförmige Masse gebildet hatte.

Die zermahlene Probe wurde dann zu je 2 g in Reagenzgläser abgewogen und mit 7 ml eiskalter 0,1 molarer KCl - Lösung gemischt. Nach 10 - minutigem sedimentieren mit 2 000 g setzten sich die Zelltrümmer und andere feste Bestandteile ab, der Überstand, "Homogenat" genannt, mit der darin gelösten AK wurde in Becher abgegossen und bei $4^{o}$ C aufbewahrt.

Diese Prozedur wurde noch zweimal mit je 9 ml KCl wiederholt und der Überstand jeweils zu dem der ersten Zentrifugation gegossen, die Gesamtmenge betrug damit am Schluss 25 ml.

Dieses unverdünnte Homogenat wurde mit "roh" gekennzeichnet und tritt auch unter dieser Bezeichnung im Ergebnis auf.

Da bei den Blutproben die AK durch das Gefrieren aus den Erythrozyten freigesetzt wurde, war ein weiterer Aufschluss nicht mehr nötig, nur zur photometrischen Bestimmung wurde noch mit 0,1 molarer KCl - Lösung im Verhältnis 1 : 10 verdünnt.

Prinzip der Aktivitätsmessung

Die Messung der Aktivität erfolgte mit einem 3-fach zusammengesetzten Test (Gl. 49.1.-3.), in dem als Substrat ADP verwendet wird.

$$2\ ADP \xrightarrow{AK} ATP + AMP \qquad (Gl.49.1.)$$

$$ATP + Glukose \xrightarrow{HK} G\text{-}6\text{-}P \qquad (Gl.49.2.)$$

$$G\text{-}6\text{-}P + NADP \xrightarrow{G\text{-}6\text{-}P\text{-}DH} 6\text{-}PG + NADPH \qquad (Gl.49.3.)$$

Bei Zugabe von AK entstehen durch Dismutation die Nukleotide AMP und ATP. Das Hilfsenzym Hexokinase (HK) phosphoryliert die im Gemisch vorhandene Glukose zu Glukose - 6 - Phosphat (G-6-P), das durch G-6-P - Dehydrogenase (G-6-P-DH) dehydriert wird und den Wasserstoff auf das ebenfalls vorhandene NADP überträgt. Während der Reduktion von NADP ändert sich die Absorption und aus dieser Änderung kann die Menge des gebildeten NADPH errechnet werden, die dem ADP - Verbrauch linear proportional ist.

Berechnung der Aktivität

Da Enzyme einen Katalysator darstellen, wird bei Bestimmungen derselben die Aktivität als Messgrösse angegeben. Als Einheit wurde die internationale Enzymeinheit (U = Unit) gewählt. 1 U bedeutet den Umsatz von 1 µmol Substrat innerhalb einer Minute (Gl. 49.4.).

$$1\ U = 1\ \mu mol/min\ Substratumsatz \qquad (Gl.\ 49.4.)$$

Mit der Gl. 49.2. kann die Aktivität pro ml Homogenat (Volumenaktivität) bestimmt werden.

$$U = \frac{dE/min \cdot 2 \cdot V}{\varepsilon \cdot b \cdot v} \qquad (Gl.\ 49.5.)$$

U = Aktivität pro ml Homogenat
dE/min = Extinktionsänderung pro Minute
2 = Faktor, da bei einem Umsatz von 2 mol ADP nur 1 mol NADPH entsteht
V = Gesamtvolumen der Messlösung
v = Volumen des eingesetzten Homogenates
b = Schichtdicke der Küvette (1cm)
$\varepsilon$ = molarer Extinktionskoeffizient (3,3 $cm^2$/ µmol für NADPH und einer Messwellenlänge $\lambda$ = 366 nm)

Da die Gesamtmenge Homogenat und deren Eiweiss bzw. Hämoglobingehalt bekannt sind, lässt sich die Aktivität der Gesamtprobe (entsprechend dem Feuchtgewicht) und des extrahierten Eiweisses errechnen.

Als Bezugsgrössen dienen also einmal das Feuchtgewicht (FG) und zum anderen das extrahierte Eiweiss (EW), bzw. beim Blut das Hämoglobin.

Herstellung der Lösungen und Testansatz

Die zur Aktivitätsmessung benötigten Lösungen wurden nach den Angaben von SCHMIDT (131) angesetzt:

1 Triäthanolamin - Puffer 0,3 mol/l mit MgCl 0,0005 mol/l, einstellen auf pH = 7,6
2 ADP 0,02 mol/l (1 g in 100 ml 5 % - igem $NaHCO_3$ lösen)
3 Glukose 0,055 mol/l (1 g in 100 ml bidest. $H_2O$ lösen)
4 NADP 0,013 mol/l (100 mg in 10 ml bidest. $H_2O$ lösen)
5 HK + G-6-P-DH zusammen in 10 ml von Lösung 1 lösen

Sämtliche Lösungen werden während der Messung im Eisbad gehalten, ansonsten erfolgt die Aufbewahrung im Kühlschrank ( $4^oC$).

Zur Bestimmung der Extinktion werden die obigen Lösungen nacheinander in die Küvette mit folgenden Mengen pipettiert:

| | |
|---|---|
| Lösung 1 | 2,6 ml |
| Lösung 2 | 0,2 ml |
| Lösung 3 | 0,1 ml |
| Lösung 4 | 0,1 ml |
| Lösung 5 | 0,1 ml |

Gestartet wird die Reaktion durch Zugabe der gelösten AK im Homogenat. Die Menge der zugegebenen AK richtete sich nach der Art der Probe, die Gangwerte, d.h. der Extinktionsanstieg pro Minute sollte zwischen 0,05 und 0,1 liegen.

Beim Muskel entsprach dies einem Probevolumen von 0,02 ml und 0,05 ml, bei der Leber 0,2 ml und 0,5 ml und beim Blut einem Volumen von 0,1 ml.

Zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurden Probenpaare gebildet, das Probenmaterial eines Schweines der Halothan - Gruppe wurde immer parallel mit dem eines Schweines der Rohypnol - Gruppe gemessen. Die Bildung der Paare erfolgte durch Auslosung; es ergaben sich folgende Paare: 1/7, 2/8, 3/9,4/6 (die Nrn. sind identisch mit den in Tabelle 45.I. aufgeführten).

Bei den Muskel- und Leberproben wurde in den Konzentrationsstufen "roh", "1 : 5" und "variabel" gemessen.

Mit der letzten genannten Verdünnung sollte der verschieden hohe Blutanteil in den Proben Leber und Muskel egalisiert werden.

Dabei wurde das Homogenat mit der für den roten Blutfarbstoff typischen Wellenlänge von $\lambda$ = 408 nm gemessen und so verdünnt, dass die AK - Lösung eines Probenpaares die-

selbe Transmission aufwies, die Erythrozyten - AK - Aktivität also in etwa gleich gross war.

Die Aktivität der Blutproben wurde nur in einer Konzentrationsstufe bestimmt.

Für die Eiweissbestimmung fand die zur quantitativen Liquor-EW - Bestimmung eingesetzte Biuret - Methode Verwendung.

Bei der Hb - Messung der Blutproben reichte die Genauigkeit nach der Hämiglobincyanidmethode mit ihren Werten aus.

In vitro Versuche

Für die in vitro Versuche wurden

A eine gesättigte Halothan - Lösung (340 ml 0,9 %-ige NaCl + 60 ml flüssiges Halothan)
B eine Rohypnol - Lösung (30 ml 0,9 %-ige NaCl + 4 mg Rohypnol) und
C physiologische Kochsalzlösung verwendet.

In Lösung A wurde Muskulatur vom Schwein 2 (Halothan - Gruppe) und vom Schwein 7 (Rohypnol - Gruppe) gelegt.

Analog dazu sollte die Rohypnol - Lösung (Lösung B) Muskulatur von den oben genannten Schweinen in vitro durchsetzen.

Lösung C diente lediglich als Vergleichslösung für die beiden vorher genannten Proben.

Die Verweildauer war jeweils 60 min, danach wurden die Proben in flüssiger Luft gefroren und in bekannter Weise die Aktivität sowie das Eiweiss bestimmt.

# 4. Ergebnisse

Um Vergleiche mit anderen Arbeiten zu ermöglichen, wurden als Bezugsgrössen der Aktivität nicht nur das extrahierte Eiweiss (EW), sondern, parallel dazu, auch das Feuchtgewicht (FG) gewählt.

Die zur Kontrolle durchgeführte Prüfung der Aktivitätsbestimmung erfolgte mit reiner Myokinase. Messungen und Berechnungen mit den in vorigen Kapiteln beschriebenen Methoden ergaben eine gute Übereinstimmung mit der von Boehringer angegebenen Aktivität.

## 4.1. Ergebnisse der in vivo Versuche

In diesem Untersuchungsgang wurde die Aktivität der gefriergestoppten Proben von Muskel und Leber, sowie die des venös entnommenen Blutes bestimmt.

### 4.1.1. Aktivitäten der Muskelproben

Bei allen Bestimmungen der Muskelproben konnte in der Bezugsgrösse EW an den mit Rohypnol behandelten Schweinen eine geringere AK - Aktivität festgestellt werden als die der Halothan - Schweine. Dies trifft sowohl für die Messungen mit rohem Homogenat als auch für die mit 1 : 5 und variabler Verdünnung durchgeführten Bestimmungen zu (Abb. 55.1.a)

Mit der Bezugsgrösse FG sind die Ergebnisse teilweise weniger deutlich, in zwei Fällen ist sogar die Aktivität der mit Rohypnol behandelten Schweine grösser als die der mit Halothan behandelten (Abb.56.1.b).

Insgesamt kann aber festgestellt werden, dass der Mittelwert der Aktivitäten ($\overline{A}$) für alle Schweinepaare in jeder

Konzentrationsgruppe für die mit Rohypnol behandelten Schweine niedriger liegt als von den Schweinen der Halothan - Gruppe.

Als weiteres Ergebnis findet man in jeder Konzentrationsstufe mit der Bezugsgrösse EW eine grössere mittlere Aktivitätsdifferenz ($\bar{d}$) als in der Bezugsgrösse FG; des weiteren ist die grösste mittlere Abweichung in beiden Bezugsgrössen mit der Konzentrationsstufe 1 : 5 beobachten.

### 4.1.2. Aktivitäten der Leberproben

Beim Vergleich der absoluten Aktivitäten zwischen den Leber- und Muskelproben zeigt sich zunächst, dass die Leberproben nur etwa 10 % der AK - Aktivität im Muskel aufweisen, dies sowohl mit EW wie auch FG als Bezugsgrössen und über alle Konzentrationsstufen hinweg.

Die Differenzen der Aktivitäten sind weniger ausgeprägt, unabhängig von der Konzentration und auch von den Bezugsgrössen (Abb.57.1. a, Abb. 58.1.b).

Auffallend gross ist der Unterschied des Paares 4/6, der nahezu aus dem Rahmen der anderen Differenzen fällt.

Prozentual gesehen schwanken die übrigen Werte jedoch mehr oder weniger um den Nullpunkt und nur durch die oben erwähnten starken Abweichungen des Paares 4/6 zeichnet sich im Mittelwert eine etwas höhere Aktivität der Rohypnol - Gruppe gegenüber den mit Halothan behandelten Schweinen ab.

Eine eindeutige Aussage über das Aktivitätsverhalten gegenüber Rohypnol und Halothan ist hier also nicht möglich und kann auch mit statistischen Mitteln nicht belegt werden.

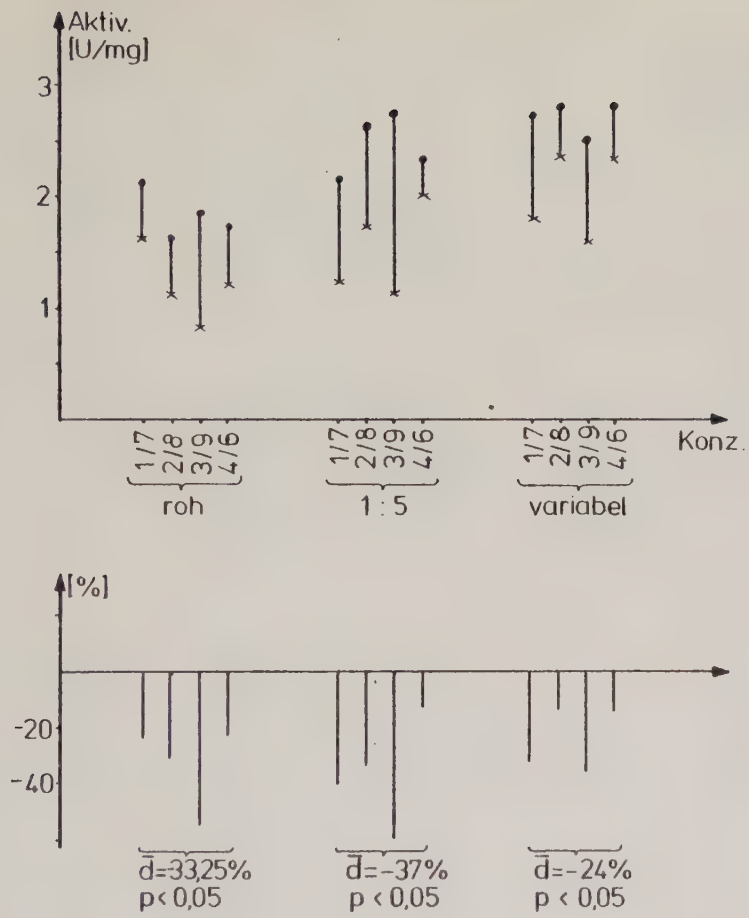


Abb. 55.1.a Aktivitäten der Muskelproben (Bezugsgrösse EW)

Abb. oben: Veränderungen der Aktivitäten in absoluten Einheiten

. = mit Halothan behandelte Schweine

x = mit Rohypnol behandelte Schweine

Abb. unten: Prozentuale Differenzen der Aktivitäten. Halothan - Aktivität = 100 %

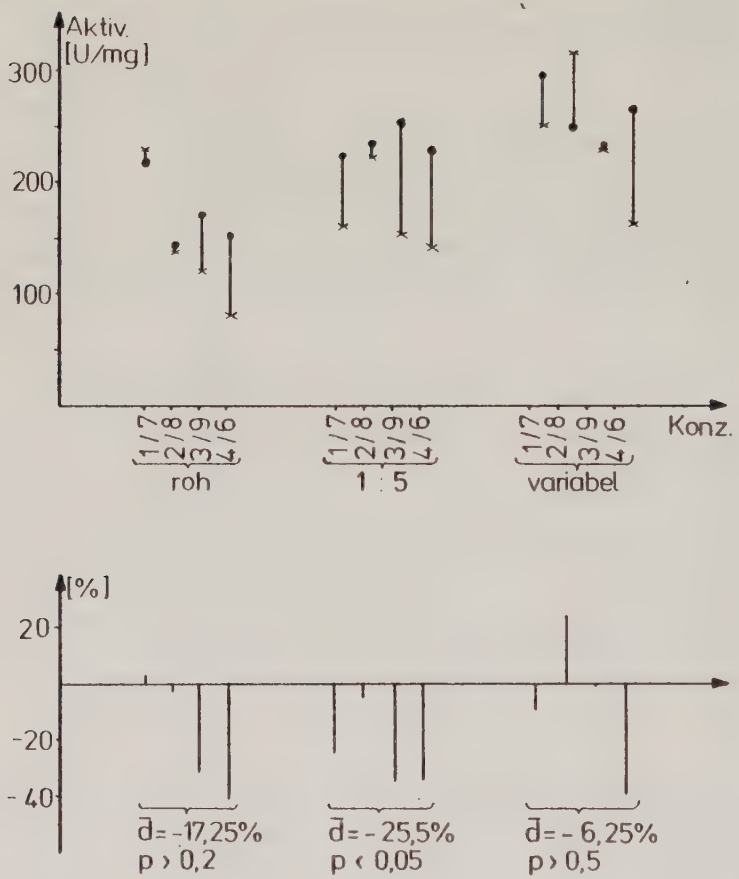


Abb. 56.1.b Aktivitäten der Muskelproben (Bezugsgrösse FG)

Abb. oben: Veränderungen der Aktivitäten in absoluten Einheiten

. = mit Halothan behandelte Schweine

x = mit Rohypnol behandelte Schweine

Abb. unten: Prozentuale Differenzen der Aktivitäten. Halothan - Aktivität = 100 %

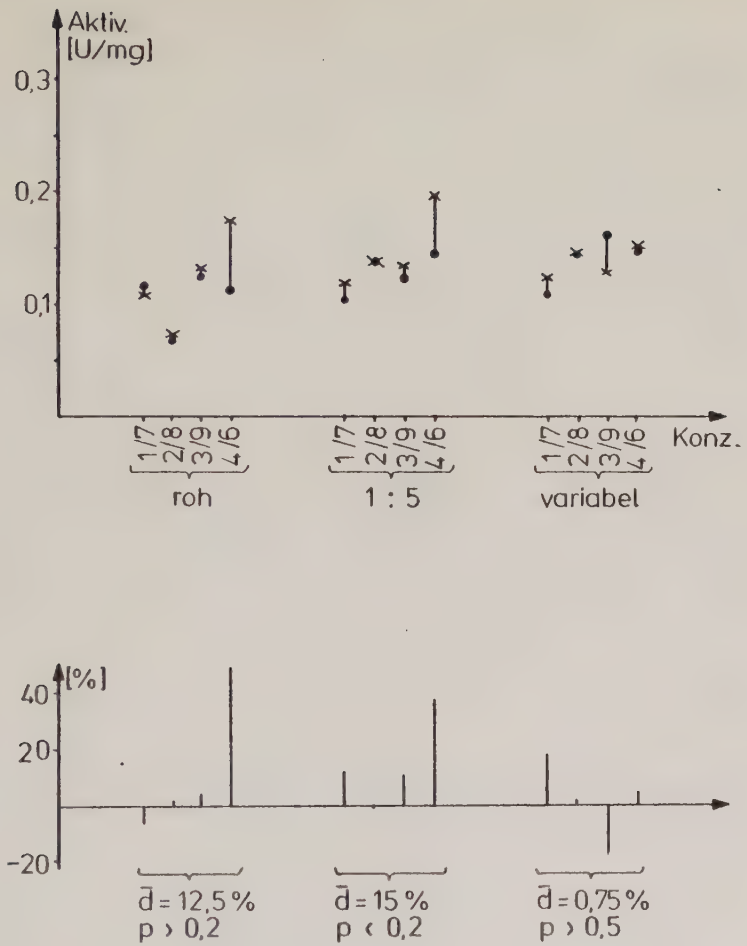


Abb. 57.1.a Aktivitäten der Leberproben (Bezugsgrösse EW)

Abb. oben: Veränderungen der Aktivitäten in absoluten Einheiten

. = mit Halothan behandelte Schweine

x = mit Rohypnol behandelte Schweine

Abb. unten: Prozentuale Differenzen der Aktivitäten. Halothan - Aktivität = 100 %

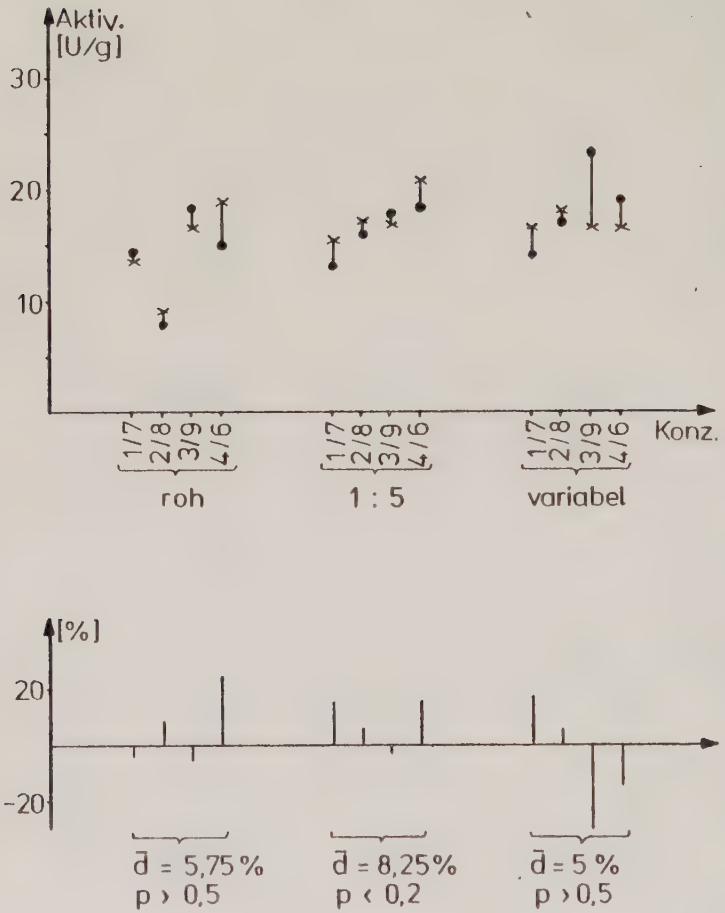


Abb. 58.1.b Aktivitäten der Leberproben (Bezugsgrösse FG)

Abb. oben: Veränderungen der Aktivitäten in absoluten Einheiten

. = mit Halothan behandelte Schweine
x = mit Rohypnol behandelte Schweine

Abb. unten: Prozentuale Differenzen der Aktivitäten.
Halothan - Aktivität = 100 %

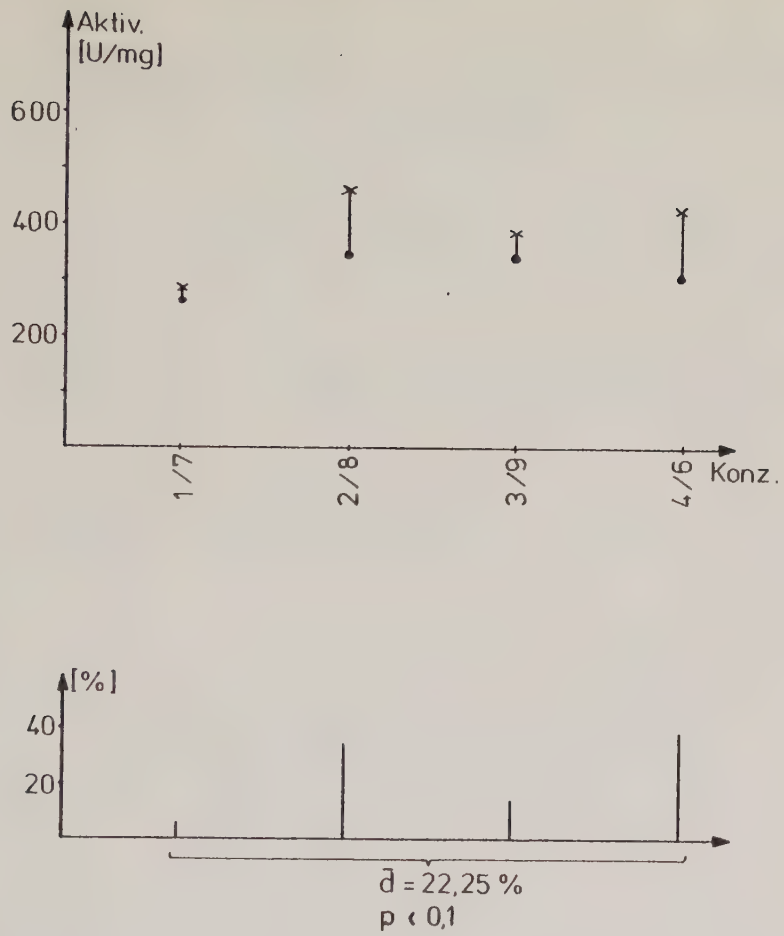


Abb. 59.1. Aktivitäten im Blut (Bezugsgrösse Hb)

Abb. oben: Veränderungen der Aktivitäten in absoluten Einheiten

. = mit Halothan behandelte Schweine

x = mit Rohypnol behandelte Schweine

Abb. unten: Prozentuale Differenzen der Aktivitäten. Halothan - Aktivität = 100 %

Unabhängig von der Richtung zeigt sich aber auch hier wieder mit der Bezugsgrösse EW eine stärkere Aktivitätsdifferenz gegenüber den Berechnungen der Bezugsgrösse FG.

### 4.1.3. Aktivitäten der festen Blutbestandteile

Hier diente als Bezugsgrösse nur das vorhandene Hämoglobin.

Die Aktivitätswerte des Blutes zeigten bei jedem Paar für die mit Rohypnol behandelten Schweine einen höheren Wert als für solche der Halothan - Gruppe (Abb.59.1.).

Für alle vier Paare ergab sich eine Mehraktivität der Rohypnol - Gruppe um einen prozentualen Mittelwert von 22,25 %.

## 4.2. Ergebnis der in vitro Versuche

### 4.2.1. Passiv mit Halothan perfundierte Muskulatur

Aus Abb. 61.1. gehen die Aktivitätsänderungen der von Halothan perfundierten Muskulatur hervor.

Alle Proben, ob sie von einem mit Rohypnol oder Halothan vorbehandeltem Schwein gewonnen wurden, zeigten in der Aktivität fallende Werte, dies galt sowohl für die Bezugsgrösse EW als auch FG.

Die Aktivität der AK ist also nach in vitro Behandlung mit Halothan geringer als vor der Behandlung.

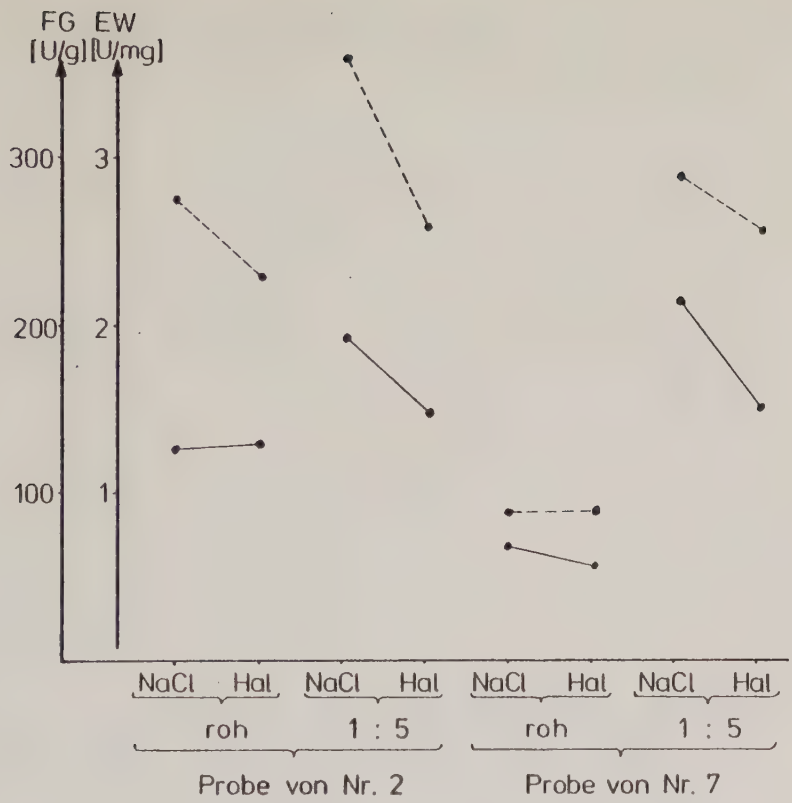


Abb. 61.1. Aktivitäten der mit Halothan perfundierten Muskelproben,

------ = Bezugsgrösse EW

——— = Bezugsgrösse FG

NaCl = Physiol. Kochsalzlösung (als Vergleichslösung)

Hal = Gesättigte Halothan - Lösung

4.2.2. Passiv mit Rohypnol perfundierte Muskulatur

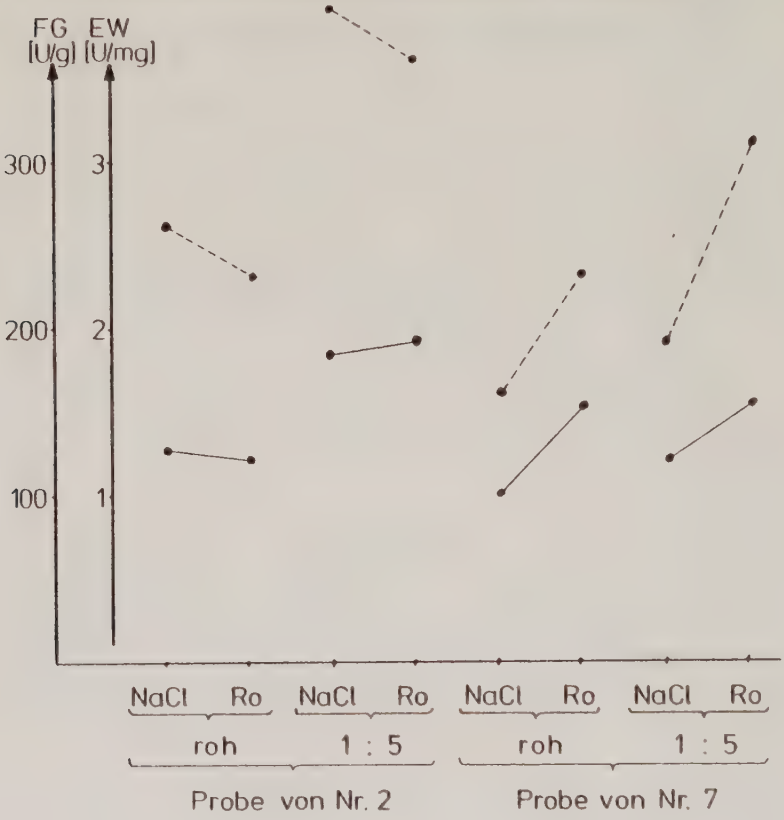


Abb. 62.1. Aktivitäten der mit Rohypnol perfundierten Muskelproben

------ = Bezugsgrösse EW

——— = Bezugsgrösse FG

NaCl = Pysiol. Kochsalzlösung (als Vergleichslösung)

Ro = Rohypnol - Lösung

Betrachtet man die Werte der mit Rohypnol behandelten Proben (Abb. 62.1.), so bietet das von Schweinen der Halothangruppe stammende Material dasselbe Bild, wenn auch nicht in solcher Deutlichkeit: die Werte zeigen fallende Tendenz.

Im Gegensatz dazu stehen die von mit Rohypnol vorbehandelten Schweinen gewonnenen Muskelproben.

Die Aktivität steigt hier nach der in vitro Behandlung mit Rohypnol an, dies sowohl in verschiedenen Konzentrationen als auch Bezugsgrössen.

## 4.3. Statistik

### 4.3.1. Grundlagen der Statistik

Mit Hilfe der Statistik ist es möglich, den Unterschied bezüglich eines Merkmals zwischen zwei verglichenen Gruppen rechnerisch zu erfassen.

Man geht dabei von der sogenannten Nullhypothese aus, sie besagt, dass zwischen zwei Gruppen keine Differenz besteht, trotzdem auftretende Unterschiede also rein zufällig sind.

Anhand des t - Testes bei paarigen Proben ist es nun möglich, die sogenannte Überschreitungswahrscheinlichkeit (P) zu berechnen, mit der die Nullhypothese abgelehnt werden kann.

### 4.3.2. Berechnung

Die Bestimmung der Wahrscheinlichkeit erfolgte nur für die in vivo - Aktivitäten, da für das angeschlossene in vitro - Experiment die Anzahl der Messungen zu gering war.

Die statistische Berechnung wurde für jedes Organ (Muskel, Leber, Blut) durchgeführt, wobei die Gesamtheit der Werte

die einer Konzentrationsstufe aus einer bestimmten Bezugsgrösse (EW, FG) umfasste.

Das Quantil (t) wird nach der folgenden Gleichung berechnet:

$$t = \frac{\bar{d} \cdot \sqrt{n}}{s} \qquad \text{(Gl. 64.1.)}$$

Dabei ist n die Anzahl der Schweinepaare, $\bar{d}$ der arithmetische Mittelwert der Differenzen und s die Standardabweichung derselben.

Aus einer Tabelle kann dann entnommen werden, ob die Differenzen zwischen den Aktivitäten zufällig sind oder ob die Differenz durch die Einwirkung der Anaesthetika hervorgerufen wird.

Die Überschreitungswahrscheinlichkeiten (P) sind in die Tabellen und Graphiken für jede Gruppe eingetragen.

# 5. Diskussion

## 5.1. Diskussion der eigenen Ergebnisse

### 5.1.1. Fehlermöglichkeiten

Wenn auch in den hier gewonnenen Ergebnissen in jeder Bestimmungsreihe eine unerwartet eindeutige, in den einzelnen Versuchen jedoch wechselnde Tendenz zu verzeichnen ist, so sollte man bei einem Vergleich der Aktivitäten doch immer die Vielzahl der möglichen Störfaktoren vor Augen haben.

Dies beginnt mit der Wahl der Schweine, bei manchen tritt kaum das MHS auf, sodass, unter Voraussetzung der Tübinger Hypothese, hier eine Art "resistente" AK vorliegt, eine Beeinflussung durch Halothan nicht nachweisbar ist.

Damit wird aber gleichzeitig auch gezeigt, dass die Ergebnisse nicht ohne Vorbehalt auf den Menschen übertragen werden können, wenn schon innerhalb der Schweinerassen solche Schwankungen zutage treten.

Weiterhin hat der Zeitpunkt der Probengewinnung einen entscheidenden Einfluss auf die Konzentration des Narkotikums in den verschiedenen Geweben. Bei zu früher Entnahme liegen möglicherweise Konzentrationsverhältnisse vor, die noch nicht zu einer AK - Hemmung in vivo führen (Abb. 39.1., Abb. 41.1.).

Während der Messung kann die falsche Wahl der $H^+$ - Konzentration, der Temperatur, der Elektrolyte ($K^+$, $Mg^{++}$, $Ca^{++}$ usw.) und anderer Parameter zu unrichtigen Ergebnissen führen (17, 112).

Beispielsweise wird mit einer $Mg^{++}$ - Konzentration zwischen $10^{-3}$ - $10^{-4}$ mol/l ein Maximum der Aktivität erreicht, die

bei einer geringeren oder höheren $Mg^{++}$ - Konzentration sehr schnell abfällt (13,17,131).

Auch die zwischenzeitliche Lagerung kann höhere oder geringere AK - Aktivitäten vortäuschen (11).

TODD et al. fanden z.B. in Kunststoffreagenzröhrchen sehr viel höhere Aktivitäten als in Glasröhrchen und durch Zusatz von Albumin wird die AK stabilisiert, die Inaktivierung erfolgt möglicherweise langsamer (30).

Schliesslich noch einige Worte zu Störmöglichkeiten in der Berechnung.

Da Bindegewebe sehr geringe Aktivitäten entfaltet, bei der Extraktion und Wägung aber mit in die Berechnung eingeht, können unterschiedliche Bindegewebsanteile in Leber und Muskulatur zu unrichtigen Ergebnissen führen (94).

Dasselbe trifft auf den stark differierenden Blutgehalt der einzelnen Organe zu.

5.1.2. Diskussion der in vivo Versuche

Auffallend ist zunächst bei der Betrachtung der Ergebnisse die Abhängigkeit der Aktivitätsdifferenzen sowohl von der Bezugsgrösse als auch von der Konzentration.

Mit EW als Bezugsgrösse fallen die Unterschiede ausnahmslos höher aus als in der Bezugsgrösse FG, die Bezugsgrösse EW stellt somit einen empfindlicheren Indikator für die Feststellung von Aktivitätsdifferenzen dar, als dies mit der Bezugsgrösse FG der Fall ist.

Weiterhin findet man innerhalb der Konzentrationsstufen durchweg in der Verdünnung 1 : 5 die grössten mittleren Aktivi-

tätsdifferenzen, dies gilt sowohl für die Aktivitäten im Muskel als auch für die in der Leber.

Ob die oben aufgezeigten Abhängigkeiten nur einen Zufallsbefund darstellen oder ob ein genereller Mechanismus vorliegt, soll weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

Man kann jedoch davon ausgehen, dass zukünftige Messungen in diesem Konzentrationsbereich und der Bezugsgrösse EW wohl die deutlichsten Ergebnisse zeitigen werden.

Besonders deutlich war der Unterschied zwischen den Aktivitäten der Rohypnol- und Halothan - Gruppen hinsichtlich der Muskel- und Blutproben.

Wie auch die statistische Auswertung zeigt, ist die Irrtumswahrscheinlichkeit (P) bei den Muskelproben sowohl in der Bezugsgrösse EW als auch FG sehr gering (Abb. 55.1.a. und Abb. 56.1.b.).

Bezüglich der Wahrscheinlichkeit gilt dasselbe für die Aktivität der festen Blutbestandteile (Abb. 59.1.).

Unerwartet ist jedoch das gegensätzliche Verhalten in Muskel und Erythrozyten bzw. festen Blutbestandteilen.

Im Muskel liegt die AK - Aktivität der Halothan - Gruppe nahezu immer über der der Rohypnol - Gruppe, während in den Erythrozyten die AK - Aktivität der Halothan - Gruppe immer unter der von Rohypnol behandelten Schweinen lag.

Trotz Zugehörigkeit zum gleichen Set zeigt sich ein höchst unterschiedliches Verhalten, das möglicherweise auf die Konzentrationsverhältnisse zurückgeführt werden kann.

Im Verlauf der Halothan - Narkose steigt der Blutspiegel langsam an, im Gegensatz dazu fällt die Konzentration des

relativ schnell in die Blutbahn injizierten Rohypnols ab, ein Vergleich zwischen Blut und Muskel erscheint daher schon problematisch.

Innerhalb der Leberproben sind keine signifikanten Aktivitätsunterschiede festzustellen (Abb. 57.1.a., Abb. 58.1.b.), es muss somit angenommen werden, dass eine unterschiedliche Wirkung von Rohypnol und Halothan auf die Leber - AK nicht vorliegt, eine Beeinflussung im Sinne einer Aktivierung bzw. Inaktivierung mit derselben Grösse jedoch möglich erscheint.

Aufgrund dieser Ergebnisse ist eine Interpretation sehr spekulativ, zumal keine Vergleichsuntersuchungen mit Schweinen vorliegen, von denen ohne Anaesthesie Proben entnommen werden konnten.

Sicher erscheint eine unterschiedliche Beeinflussung der AK durch Rohypnol und Halothan im Muskel und Erythrozyten, also AK eines einheitlichen Sets.

Dieses Verhalten unterstützt damit die These einer Angriffsmöglichkeit der Anaesthetika und/oder deren Metaboliten an AK vom Muskeltyp (mit zwei freien -SH - Gruppen).

Da jedoch die Muskelproben der Halothan - Gruppe eine höhere Aktivität aufweisen als die der Rohypnol - Gruppe, wäre eine Aktivierung der AK durch Halothan denkbar, es besteht aber ebenso die Möglichkeit einer Inaktivierung durch Rohypnol, beide würden zu den ermittelten Aktivitätsunterschieden führen.

Ob insgesamt eine Aktivierung oder Inaktivierung mit variierender Stärke, durch beide Anaesthetika erfolgte, kann ohne Vergleichsmöglichkeit ebenfalls nicht geklärt werden.

Unklar bleiben auch die Ergebnisse hinsichtlich der Erythrozyten - AK. Hier müsste aber, im Gegensatz zum Muskel, die

AK durch Rohypnol aktiviert bzw. durch Halothan inaktiviert werden.

In der Leber wirkt sich die Art des Narkosemittels unter den gegebenen Verhältnissen dagegen nicht unterschiedlich aus, so dass die Leber - AK als Indifferenztyp gegenüber den beiden Anaesthetika klassifiziert werden muss.

### 5.1.3. Diskussion der in vitro Versuche

Weitere Schlüsse könnten aus dem in vitro Versuch hinsichtlich des AK - Verhaltens in der Muskulatur gezogen werden.

Bei Halothan-vorbehandeltem Muskel (Halothan - Narkose) erfolgte sowohl mit Rohypnol als auch mit Halothan in vitro eine Inaktivierung.

Ein anderes Verhalten zeigt sich aber bei Muskelproben, die von einem Schwein mit vorausgegangener Rohypnol - Narkose gewonnen wurden.

Gegenüber dem Ausgangswert erfolgt eine Aktivierung durch Rohypnol, während es mit Halothan zu einer Inaktivierung kommt.

Danach läge eine Aktivierung durch Rohypnol im Bereich des Möglichen, Halothan tendiert zur Inaktivierung.

Es muss jedoch davor gewarnt werden, aus diesen Messungen allgemein gültige Gesetze abzuleiten, da die Ergebnisse aus nur sehr wenigen Aktivitätsbestimmungen erzielt und damit die Streuungen nicht berücksichtigt wurden.

## 5.2. Vergleich mit anderen Ergebnissen

Bei einem Vergleich der errechneten Aktivitäten mit denen anderer Autoren wurde eine recht gute Übereinstimmung er-

zielt (86,94,142). In der Literatur finden sich jedoch auch Werte, die für Leber und Muskel wesentlich höher liegen als die in dieser Arbeit errechneten Werte (44,86).

Diesem Umstand liegt möglicherweise das methodische Vorgehen zugrunde, da sich die Aktivitäten bei nur geringfügig geänderten Versuchsbedingungen schon um Grössenordnungen von Zehnerpotenzen verschieben können.

Übereinstimmend mit den eigenen Ergebnissen wurde von den meisten Autoren eine im Muskel wesentlich höhere Aktivität gefunden als in der Leber.

KITCHIN et al. (86) finden sogar einen 50 - 100 fach höheren Wert gegenüber dem hier gemessenen Faktor 10.

Gründe für diese doch relativ grosse Aktivitätsdifferenz könnten in der Wahl der Probeentnahme zu suchen sein, da sich, wie schon erwähnt, die Konzentrationen der Narkotika in Leber und Muskel sehr unterschiedlich verhalten.

Wenn jedoch von anderen Autoren ähnliche Aktivitätsverhältnisse gefunden werden, kann dieser Unterschied damit nicht erklärt werden.

Auch die Lokalisation kann zu solchen Aktivitätsdifferenzen führen.

Die Leber - AK findet sich vorwiegend im äusseren mitochondrialen Kompartiment, in der Muskelzelle liegt der überwiegende Anteil im Zytoplasma vor (40,81).

Es wäre denkbar, dass während des Homogenisierens in flüssiger Luft die äussere Mitochondrienmembran zu einem geringeren Grad zerstört wird, als die Zellmembran des Muskels, mit der Folge einer geringeren AK - Freisetzung aus der Leber.

Doch auch hier wurde von anderen Autoren mit unterschiedlichsten Methoden (Gefrieren, Osmose, Ultraschall) eine ähnliche Aktivitätsverteilung der AK nachgewiesen (19).

Es bleibt somit noch die ungleiche Isoenzymverteilung der AK. Von mehreren Autoren wurde eine unterschiedliche Reaktivität der AK aus Muskel und Leber aufgezeigt, bedingt durch freie -SH - Gruppen der Muskel - AK. Da diese -SH - Gruppen der Leber - AK eine Disulfidverbindung eingehen, ist die Raktivität und möglicherweise dadurch auch die AKtivität derselben stark eingeschränkt und somit wesentlich geringer als die Muskelaktivität (35,102,114,130).

Das Ergebnis einer 10 - fach höheren Muskelaktivität gegenüber der Leber - AK dürfte mit dieser Erklärung der Wirklichkeit wohl am ehesten entsprechen.

## 5.3. Gemeinsame Aspekte des AK - Verhaltens und des Auftretens eines MHS

### Entscheidendes Organ: Die Muskulatur

Wie schon im Ergebnis gezeigt wurde, ist bezüglich der Leber - AK keine unterschiedliche, im Muskel dagegen eine besonders deutliche Beeinflussung durch Rohypnol und/oder Halothan festzustellen. Dies steht auch im Einklang mit den Beobachtungen während eines MHS.

Die leberspezifischen Enzyme sind kaum erhöht, das muskelspezifische CPK aber sehr stark (155), das Geschehen spielt sich also im wesentlichen in der Muskulatur ab, wo normalerweise auch die höchste AK - Aktivität gefunden wird.

Hier zeigen sich auch die Aktivitätsdifferenzen am deutlichsten, d.h., der Einfluss der Anaesthetika auf die AK ist hier am grössten.

Die mittlere Abweichung war im Muskel 37,5 % ($P \leq 0,05$), während in der Leber nur ein Wert von 14,75 % ($P \geq 0,5$), also ohne jegliche Signifikanz erreicht wurde.

Gemeinsamkeit: Erbliche Belastung

Eine Interpretation des Verhaltens der Erythrozyten - AK ist mit den Theorien von KHOO et al. (84) und WILSON et al. (150) möglich. Danach zählt die AK der Erythrozyten zum Muskeltyp, sie besitzt zwei freie -SH - Gruppen, ist also, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, durch Anaesthetika zu beeinflussen. Andererseits kann aber die AK vom Muskeltyp immer noch weiter in die Isoenzyme AK 1 und AK 2-1 aufgespalten werden, entsprechend einer homzygoten bzw. heterozygoten Form ($AK^1AK^1$, $AK^1AK^2$).

Damit kann das unterschiedliche Verhalten von Muskel - und Erythrozyten - AK erklärt werden: im Muskel müsste die homozygote (heterozygote), in den Erythrozyten aber die heterozygote (homozygote) Form der AK vorliegen.

Neben der autosomalen Vererbung (AK 1 und AK 2-1 werden von Chromosom 1 determiniert) wird aber auch deutlich, dass von der Erythrozyten - Form nicht auf die Muskel - Form geschlossen werden kann. Ein Ergebnis, das auch mit den Untersuchungen von SCHMIDT et al. (132) im Einklang steht. Ein Screening - Test allein mit der Erythrozyten - AK ist demnach nicht möglich.

Das oben gezeigte Verhalten der autosomalen Vererbung einer eventuellen AK - Defiziens (15,77,142) bildet im übrigen eine weitere Gemeinsamkeit mit dem MHS. Auch hier liegt ein autosomaler (dominanter) Erbgang mit familiärer Häufung vor (47,88).

Gemeinsamkeit: Muskelabnormitäten

Ein weiterer Aspekt sind die bei MH - Patienten gehäuft vorkommenden Muskelabnormitäten (z.B. Muskeldystrohie vom Typ Duchenne), die nach KAESER (78) auf einem genetisch bedingten generalisierten Membrandefekt beruhen könnten.

In diesen Fällen ist die intramuskuläre AK - Aktivität erniedrigt und zusätzlich zeigt sich ein geändertes Verhalten gegenüber bestimmten chemischen Reagenzien (86,146).

Es muss hier allerdings die Frage nach Ursache und Wirkung gestellt werden.

Möglicherweise tritt AK passiv durch die genetisch gestörte Membran, das veränderte AK - Verhalten müsste dann noch weiter erklärt werden.

Bei einer primären Störung der AK - Aktivität ist die ausreichende Energiebereitstellung (in Form von ATP) für die Aufrechterhaltung der physiologischen Membrandichte nicht mehr gewährleistet, die AK kann, neben anderen Enzymen, in die Blutbahn abfliessen (72). Damit wäre sowohl die Membranstörung als auch die AK - Aktivitätsänderung erklärt.

Gemeinsamkeit: Veränderte Adeninnukleotid - Werte

Unterstützt wird die letzte Hypothese durch die Feststellung von ISAACS und HEFFRON (76), die einen verminderten ATP - Gehalt im Muskel von MH - anfälligen Individuen gefunden haben.

SZEINBERG et al. (142) sowie BOIVIN und Mitarbeiter (15) finden zwar einen normalen ATP - Gehalt aber einen zu hohen Anteil ADP und AMP bei Patienten mit einer AK - Defiziens.

Mit der von ATKINSON (3) aufgestellten Hypothese des "Adenylate Energy Charge" - Mechanismus lassen sich diese drei

Befunde in Einklang bringen. Durch ATP - Verbrauch entsteht vermehrt ADP und AMP, die AK ist nicht mehr in der Lage, das ADP in genügendem Masse zu ATP zu phosphorylieren. Die Folge: ATP sinkt, bzw. andere Quellen werden zur Energiegewinnung mit herangezogen (Kreatinphosphat ist ebenfalls erniedrigt), ADP und AMP sind erhöht, ein neues "Adenylate Energy Charge" - Niveau stellt sich ein.

Denkbarer Mechanismus

Aufgrund der oben genannten Gemeinsamkeiten ist ein Zusammenhang AK - MHS durchaus nicht unwahrscheinlich. Ausgehend von SCHIRMER et al. (130) kommt es durch bestimmte Reagenzien zu einer Aktivitätsänderung der AK in vivo, wobei eine Minderaktivität denkbar ist.

Bei einer gesunden Person, also mit normaler AK - AKtivität, kommt es dadurch möglicherweise auch zu einer Inaktivierung, die vorhandene Restaktivität ist jedoch noch ausreichend, um genügend ATP bereitzustellen.

Trifft ein auslösendes Agens jedoch auf eine (genetisch) schon verminderte AK - Aktivität, so kann eine weitere Inaktivierung dazu führen, dass die "Adenylate Energy Charge" nicht mehr aufrecht erhalten werden kann und damit das ATP abfallen und ADP ansteigen lässt.

Das bedeutet aber, alle ATP - verbrauchenden Vorgänge kommen zum Stillstand. Dazu zählen die Kontraktionsvorgänge in der Muskulatur, Phosphorylierung von Metaboliten aber auch die hier besonders wichtige Funktion der Carrier, die als Vehikel für alle möglichen Stoffe und Verbindungen den Transport durch Membranen hindurch ermöglichen.

Fällt diese Transportfunktion aus, so kann es zu den in vorangegangenen Abschnitten beschriebenen Vorgängen während der MH kommen, wenn $Ca^{++}$ nicht mehr in die $Ca^{++}$ - speichernden Cisternen zurücktransportiert werden kann.

Mögliche Aktivitätsänderung der AK auf der Ebene der Enzymstruktur

Vorstellbar sind drei verschiedene Mechanismen, die einzeln oder zusammen zur Inaktivierung führen könnten:

- eine kompetetive Hemmung
- eine (reversible) Oxydation von -SH - Gruppen
- eine Konformationsänderung

Nach dem von SCHULZ et al. (134) beschriebenen Modell besitzt das AK - Enzym eine Spalte, in der sich die zwei Substratbindungsorte (mit vier Aminosäuren), eine Aminosäure für Metallionen und ein Cystein in enger räumlicher Nachbarschaft befinden.

Eine Bindung einer oder mehrerer dieser für die Katalyse wichtigen Aminosäuren kann somit zu den oben genannten Inaktivierungsmechanismen führen.

Ein Beispiel für kometetive Hemmung ist das von LIENHARD et al. (96) beschriebene $Ap_4A$, bzw. das $Ap_5A$, die, abhängig vom Abstand der Base, eine schwächere oder stärkere Inaktivierung hervorrufen.

Dass auch die Oxydation der -SH - Gruppe mit $H_2O_2$ zu einer reversiblen Inaktivierung führt, zeigten schon COLOWICK et al. 1943 (39), sowie SIKEVITZ et al. (135) gelang auch der Nachweis einer AK - Inaktivierung durch fluorierte Reagenzien und Fluorid ($F^-$), beruhend auf einer Bindung an das Cystein 25, das sich in enger Nachbarschaft zu den beiden Substratbindungsorten befindet.

Ob es dabei zu einer Konformationsänderung kommt ist nicht ganz sicher, wird aber von der erstgenannten Autorengruppe als wahrscheinlich betrachtet.

Ist eine AK - Inaktivierung durch Halothan möglich

Die Wirkung des Anaesthetikums "Halothan" auf die AK wäre sowohl mit einem kompetetiven Hemmungsmechanismus als auch mit einer (fluoridbedingten) Oxydation oder Konformationsänderung erklärbar.

Das kleine Halothan - Molekül ist mit einiger Wahrscheinlichkeit in der Lage, in den Spalt des AK - Enzyms zu gelangen, mit der Folge der Verdrängung des ursprünglichen Substrates.

Da jedoch noch viele andere künstliche Stoffe mit ähnlicher chemischer Zusammensetzung zu finden sein dürften, muss neben der Grösse die Struktur mit von Bedeutung sein.

Bei ähnlichen Strukturmerkmalen anderer Medikamente müssten diese dann ebenfalls zu einer MH führen. Dies ist auch tatsächlich der Fall, wie schon von verschiedenen Autoren gezeigt wurde (10).

Möglicherweise ist auch das Fluor mitentscheidend, das ja, wie oben erwähnt,ebenfalls zu einer Inaktivierung führt (75,135).

Damit müsste allerdings auch das Rohypnol mit zu den auslösenden Agenzien gezählt werden, da dieses Anaesthetikum ebenfalls fluoriert ist. Durch die strukturelle Ähnlichkeit des Rohypnols mit den AK - Substraten, den Adeninnukleotiden, wäre sogar noch eine stärkere Inaktivierung zu erwarten.

Ob damit der tatsächliche Befund in dieser Arbeit dahingehend interpretiert werden kann, muss jedoch spekulativ bleiben. Da sich Rohypnol noch nicht im Handel befindet, ist die Anwendungsbreite und damit auch die Häufigkeit der Anwendung noch relativ gering, so dass bisher auch noch kei-

ne Berichte über Rohypnol - induzierte MH - Fälle gefunden wurden.

Möglichkeit der Auslösung von MH über eine Inaktivierung der AK nach dem Modell der Tübinger Autorengruppen

Nach dem bisher Gesagten ist somit die Möglichkeit der Auslösung einer MH durch eine AK - Inaktivierung gegeben.

Ob Halothan zu einer solchen Inaktivierung in vivo führt, kann nicht sicher gesagt werden, aufgrund der nichtvorhandenen Vergleichsmöglichkeit mit nichtanaesthesierten Schweinen ist eine Aussage über die Richtung (Aktivierung - Inaktivierung) der AK - Änderung nicht möglich.

Unter Beachtung der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse kann jedoch eine Beeinflussung der AK im Muskel und Erythrozyten im Rahmen der statistischen Wahrscheinlichkeit als gesichert angenommen werden.

Bei Patienten die nun schon eine genetisch bedingte AK - Minderaktivität aufweisen, wie sie von SCHMITT et al. (132) und JUNGER et al. (77) gezeigt wurde, wird es dann durch eine weitere Verringerung der Aktivität mit bestimmten Anaesthetika zur Dekompensation mit den ausführlich beschriebenen Folgen der MH kommen.

Schlussfolgerungen

Zum Erhalt eindeutiger und gesicherter Beweise für die aufgestellte Hypothese, der AK - Inaktivierung durch Halothan, sollte in zukünftigen Versuchen mit einer grösseren Anzahl von Tieren gearbeitet werden, um die Wahrscheinlichkeit eines falsch positiven Ergebnisses weiter zu senken.

Des weiteren dürfen als Kontrollgruppe keine Proben verwendet werden, die von medikamentös anaesthesierten Tieren ent-

nommen wurden, da durch sie ebenfalls eine bisher unbekannte Beeinflussung der AK zu befürchten ist.

Von besonderem Interesse ist im Hinblick auf einen Screening - Test auch das Verhalten der Erythrozyten - AK in Abhängigkeit von der Muskel - AK, während die AK der Leber für die weitere Forschung von geringerer Bedeutung sein dürfte.

Mit dem Beweis einer eindeutigen Abhängigkeit Muskel - AK - Erythrozyten - AK und einer weiteren Stützung der Hypothese einer MH - Auslösung durch Halothan bestünde für die Zukunft die Hoffnung, durch eine einfache Blutentnahme MH - gefährdete Personen schon präoperativ zu erkennen.

Mit einer solchen Methode hätten die Anaesthesisten ohne unverhältnismässig grossen Aufwand die Möglichkeit, schon vor dem Auftreten dieses gefürchteten Narkosezwischenfalles Massnahmen zu ergreifen, die eine Gefährdung des Patienten durch die Anaesthesie ausschliessen, und ihm damit möglicherweise das Leben zu retten.

## 6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss von Halothan auf die Aktivität der Adenylatkinase im Muskel, der Leber und den Erythrozyten geprüft und ein möglicher Zusammenhang zwischen Adenylatkinase - Inaktivierung und dem Malignen Hyperthermie - Syndrom aufgezeigt werden.

Adenylatkinase (AK) ist ein ubiquitär vorkommendes Enzym, dessen Fuktion am besten mit der Gleichung

$$2\ ADP \xrightleftharpoons{AK} ATP + AMP$$

beschrieben wird.

Bei einer Inaktivierung der AK kann nicht mehr genügend ATP bereitgestellt werden, so dass es zu einem Zusammenbruch der gesamten Energieerzeugung des Körpers kommt.

Die Maligne Hyperthermie (MH) stellt eine sehr ernste Komplikation während der Narkose (am häufigsten bei Halothan-Narkosen) dar.

Dabei kommt es zu einer sehr starken Erwärmung des Körpers, meistens gepaart mit einer Rigidität der Muskulatur.

Entscheidend für diese Erscheinungen ist die Nichtrückresorption von $Ca^{++}$ in die physiologischen Speicher. Es wird davon ausgegangen, dass die aktive Transportfunktion der Membranen gestört ist, diese ist aber ATP - abhängig, so dass eine Verbindung zwischen AK - Inaktivierung und Membranstörung vermutet werden kann.

Im Experiment wurde je vier Schweinen eine Narkose mit Halothan und Rohypnol verabreicht. Während der Narkose wurden

die Organe Muskel und Leber nach der Gefrierstoppmethode entnommen, die Blutgewinnung erfolgte durch Venenpunktion.

Zur Gewinnung eines flüssigen Homogenates in dem die AK gelöst war, wurden Muskel und Leber unter flüssiger Luft homogenisiert, die Erythrozyten durch die Lagerung bei - 25 $^{o}$C lysiert.

Die Aktivitätsbestimmung erfolgte mit einer dreifach zusammengesetzten Reaktion.

Im Ergebnis zeigt sich im Muskel und Blut ein deutlicher Aktivitätsunterschied zwischen Halothan - und Rohypnol - narkotisierten Schweinen.

Im Muskel war die AK - Aktivität der mit Halothan behandelten Schweine wesentlich grösser als die der Schweine mit Rohypnol - Narkose.

In den Erythrozyten zeigte sich ein umgekehrtes Bild, die Halothan - Gruppe wies geringere AK - Aktivitäten auf als die Rohypnol - Gruppe.

Die Leber - Aktivität verhielt sich indifferent, es waren keine statistisch gesicherten Unterschiede gegeben.

Anhand dieser Ergebnisse konnte der Einfluss von Anaesthetika auf die AK - Aktivität im Muskel und Erythrozyten gezeigt werden.

Unklar bleibt aber die Art der Beeinflussung, ob Aktivierung oder Inaktivierung, da keine Vergleichsmöglichkeiten vorhanden waren.

Es ist jedoch denkbar, durch den nachgewiesenen Einfluss der Narkotika eine schon bestehende, genetisch bedingte

Minderaktivität der AK weiter bis zur Dekompensation zu inaktivieren und damit die MH auszulösen.

## 7. T a b e l l e n

Aus den folgenden Tabellen ist die Zuordnung der gemessenen Aktivitäten zu den Konzentrationsstufen und den Schweinen ersichtlich.

Die Nummern stimmen mit denen der Tabelle 45.I. überein.

Die Bezugsgrössen sind bei den Muskel- und Leberproben das extrahierte Protein (EW) und das Feuchtgewicht (FG), bei den Blutproben diente das Hämoglobin (Hb) als Bezugsgrösse.

In der Spalte "Behandlung" des in vitro Versuches bedeutet "ohne Hal", "ohne Ro": die Proben wurden von physiologischer Kochsalzlösung perfundiert; "mit Hal", "mit Ro": 60 - minütige Perfusion mit Halothan - bzw. Rohypnol - Lösung.

### 7.1. Probematerial: Blut

| Nr. | Konz. | Aktivität Bezugsgrösse Hb (U/mg) | Irrtums-wahrschein-lichkeit |
|---|---|---|---|
| 1 | 1 : 10 | 0,270 | |
| 7 | " | 0,285 | |
| 2 | " | 0,345 | |
| 8 | " | 0,464 | kleiner als 10 % |
| 3 | " | 0,341 | |
| 9 | " | 0,388 | |
| 4 | " | 0,308 | |
| 6 | " | 0,424 | |

## 7.2. Probematerial: Leber

| Nr. | Konz. | Aktivität Bezugsgrösse EW (U/mg) | FG (U/g) | Irrtums-wahrschein-lichkeit |
|---|---|---|---|---|
| 1 | roh | 0,112 | 14,2 | |
| 7 | " | 0,105 | 13,5 | |
| 2 | " | 0,069 | 8,1 | |
| 8 | " | 0,071 | 8,9 | grösser als 20 % (Bez.gr.EW) |
| 3 | " | 0,127 | 18,2 | |
| 9 | " | 0,133 | 16,8 | grösser als 50 % (Bez.gr.FG) |
| 4 | " | 0,116 | 14,9 | |
| 6 | " | 0,174 | 18,7 | |
| 1 | 1 : 5 | 0,105 | 13,3 | |
| 7 | " | 0,118 | 15,3 | |
| 2 | " | 0,139 | 16,1 | |
| 8 | " | 0,139 | 17,0 | kleiner als 20 % (Bez.gr.EW) |
| 3 | " | 0,122 | 17,4 | |
| 9 | " | 0,135 | 17,0 | kleiner als 20 % (Bez.gr.FG) |
| 4 | " | 0,144 | 18,4 | |
| 6 | " | 0,199 | 21,2 | |
| 1 | 1 : 5 | 0,108 | 13,9 | |
| 7 | 1 : 5,6 | 0,127 | 16,4 | |
| 2 | 1 : 5 | 0,146 | 16,9 | |
| 8 | 1 : 5,3 | 0,148 | 18,0 | grösser als 50 % (Bez.gr.EW) |
| 3 | 1 : 6,7 | 0,161 | 23,0 | |
| 9 | 1 : 5 | 0,129 | 16,3 | grösser als 50 % (Bez.gr.FG) |
| 4 | 1 : 8,3 | 0,148 | 19,0 | |
| 6 | 1 : 5 | 0,154 | 16,3 | |

7.3. Probematerial: Muskel

| Nr. | Konz. | Aktivität Bezugsgrösse EW (U/mg) | FG (U/g) | Irrtums-wahrschein-lichkeit |
|---|---|---|---|---|
| 1 | roh | 2,1 | 224 | |
| 7 | " | 1,6 | 232 | |
| 2 | " | 1,6 | 143 | |
| 8 | " | 1,1 | 140 | kleiner als 5 % (Bez.gr.EW) |
| 3 | " | 1,8 | 170 | |
| 9 | " | 0,8 | 124 | grösser als 20 % (Bez.gr.FG) |
| 4 | " | 1,7 | 155 | |
| 6 | " | 1,3 | 88 | |
| 1 | 1 : 5 | 2,1 | 225 | |
| 7 | " | 1,2 | 168 | |
| 2 | " | 2,6 | 234 | |
| 8 | " | 1,7 | 222 | kleiner als 5 % (Bez.gr.EW) |
| 3 | " | 2,7 | 252 | |
| 9 | " | 1,1 | 157 | kleiner als 5 % (Bez.gr.FG) |
| 4 | " | 2,3 | 217 | |
| 6 | " | 2,0 | 141 | |
| 1 | 1 : 7 | 2,7 | 287 | |
| 7 | 1 : 11 | 1,8 | 254 | |
| 2 | 1 : 5 | 2,8 | 251 | |
| 8 | 1 : 11 | 2,4 | 316 | kleiner als 5 % (Bez.gr.EW) |
| 3 | 1 : 5 | 2,5 | 233 | |
| 9 | 1 : 17 | 1,6 | 232 | grösser als 50 % (Bez.gr.FG) |
| 4 | 1 : 6,4 | 2,8 | 262 | |
| 6 | 1 : 5 | 2,4 | 159 | |

## 7.4. In vitro Versuch

| Nr. | Konz. | Behandlung | Aktivität Bezugsgrösse EW (U/mg) | FG (U/g) |
|---|---|---|---|---|
| 2 | roh | ohne Hal | 2,4 | 126 |
| 2 | roh | mit Hal | 2,3 | 128 |
| 2 | 1 : 5 | ohne Hal | 3,6 | 193 |
| 2 | 1 : 5 | mit Hal | 2,6 | 149 |
| 7 | roh | ohne Hal | 0,9 | 69 |
| 7 | roh | mit Hal | 0,9 | 56 |
| 7 | 1 : 5 | ohne Hal | 2,9 | 211 |
| 7 | 1 : 5 | mit Hal | 2,6 | 153 |
| 2 | roh | ohne Ro | 2,6 | 125 |
| 2 | roh | mit Ro | 2,3 | 120 |
| 2 | 1 : 5 | ohne Ro | 3,9 | 184 |
| 2 | 1 : 5 | mit Ro | 3,6 | 190 |
| 7 | roh | ohne Ro | 1,6 | 100 |
| 7 | roh | mit Ro | 2,3 | 155 |
| 7 | 1 : 5 | ohne Ro | 1,9 | 119 |
| 7 | 1 : 5 | mit Ro | 3,1 | 153 |

## 8. Literaturverzeichnis

1. ADELMANN, R.C., C.-H. LO, S. WEINHOUSE:
Dietary and hormonal effects on adenosine triphosphate : adenosine Monophosphate phophotransferase activity in rat liver.
J. biol. Chem. 243, 2538 - 2544 (1968)

2. ATKINSON, D.E.:
Biological feedback control at the molecular level.
Science 150, 851 - 857 (1965)

3. ATKINSON, D.E.:
The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers.
Biochemistry 7, 4030 - 4034 (1968)

4. ATKINSON, D.E. and G. M. WALTON:
Adenosine triphosphate conservation in metabolic regulation.
J. biol. Chem. 242, 3239 - 3241 (1967)

5. AZEVEDO, E.S.:
Adenylate kinase and phosphogluconate dehydrogenase polymorphisms in Northeastern Brazil.
Am. J. hum. Genet. 22, 1 - 5 (1970)

6. BALLARD, F.J.:
Adenine nucleotides and the adenylate kinase equilibrium in livers of fetal and newborn rats.
Biochem. J. 117, 231 - 235 (1970)

7. BARMAN, Th.E.:
Adenylate kinase. In: BARMANN, Enzyme handbook, Vol. I, 448 - 449, Berlin, Heidelberg, New York: Springer 1969

8. BENDALL, J.R.:
Myokinase as a relaxing factor in muscle.
Nature 173, 548 (1954)

9. BERG, K.:
Genetic studies of the adenylate kinase (AK) polymorphism.
Hum. Hered. 19, 239 - 248 (1969)

10. BERGMANN,H.,B. BLAUHUT:
Maligne Hyperthermie. In:
Anaesthesiologie und Wiederbelebung. Bd. 91,
Eds.: R.FREY, F.KERN, O. MAYRHOFER,
Berlin, Heidelberg, New York: Springer 1975

11. BERGMEYER, H.U., E. BERNT, M. GRASSL und G. MICHAL:
Umgang mit biochemischen Reagentien und Probematerial. In: BERGMEYER, Methoden der enzymatischen Analyse, Band I, 2. Aufl., 125 - 143, Weinheim/Bergstrasse: Chemie 1970

12. BERNHARDT, D. und H. SCHILLER:
Maligne Hyperthermie in Allgemeinanaestesie.
Anaesthesist 22, 367 - 372 (1973)

13. BLAIR, J. McD.:
Magnesium, Potassium, and the adenylate kinase equilibrium.
Eur. J. Biochem. 13, 384 - 390 (1970)

14. BÖTTGER, P., M. DOEHN, K. HORATZ und G. KESSLER:
Maligne Hyperthermie durch Allgemeinanästhesie.
Anaesthesiol. Intensivmed. Praxis 10, 13-16 (1975)

15. BOIVIN, P., C. GALAND, J! HAKIM, D. SIMONY et M. SELIGMAN:
Une nouvelle erythroenzymopathie.
Presse med. 79, 215 - 218 (1971)

16. BORK, K., G.W. KORTING und G. FAUST:
Der Anstieg einiger Serumenzyme (GOT, LDH, CPK, MK) nach Ganzkörpermuskelmassage und seine Bedeutung bei Dermatomyositis.
Klin. Wochenschr. 50, 332 - 333 (1972)

17. BOWEN, W. J., and T. D. KERWIN:
The kinetics of myokinase. II. Studies of heat denaturation, the effects of salts and the state of equilibrium.
Arch. Biochem. Biophys. 64, 278 - 284 (1956)

18. BOWMAN, J. E., H. FRISCHER, F. AJMAR, P.E. CARSON, M. K. GOWER:
Population, family and biochemical investigation of human adenylate kinase polymorphism.
Nature 214, 1156 - 1158 (1967)

19. BRDICZKA, D., D. PETTE, G. BRUNNER und F. MILLER:
Kompartimentierte Verteilung von Enzymen in Rattenlebermitochondrien.
Eur. J. Biochem. 5, 294 - 3+4 (1968)

20. BRITT, B.A.:
Recent advances in malignant hyperthermia.
Anesth. Analg. (Cleve) 51, 841 - 849 (1972)

21. BRITT, B.A.:
Zur Behandlung der malignen Hyperthermie.
Anaesthesist 21, 201 - 205 (1972)

22. BRITT, B.A.:
Malignant hyperthermia: Diagnosis and treatment.
Contemp. Surg. 4, 97 - 104 (1974)

23. BRITT, B.A., L. ENDRENYI, D.L. CADMAN:
Calcium uptake into muscle of pigs susceptible to malignant hyperthermia: in vitro and in vivo studies with and without halothane.
Br. J. Anaesth. 47, 650 - 653 (1975)

24. BRITT, B.A., L. ENDRENYI, R.L. BAKCLAY, D.L. CADMAN:
Total calcium content of skeletal muscle isolated from humans and pigs susceptible to malignant hyperthermia.
Br. J. Anaesth. 47, 647 - 649 (1975)

25. BRITT, B.A., L. ENDRENYI, W. KALOW, P.L. PETERS:
The adenosine triphosphate (ATP) depletion test: Comparison with the caffeine contracture test as a method of diagnosing malignant hyperthermia susceptibility.
Can. Anaesth. Soc. J.23, 624 - 635 (1976)

26. BRITT, B.A., L. ENDRENYI, D.L. CADMAN, H.M. FAN, H. Y.-K. FUNG:
Porcine malignant hyperthermia.
Anesthesiology 42, 292 - 300 (1975)

27. BRITT, B.A., W. KALOW, A. GORDON, J.G. HUMPHREY and B. REWCASTLE:
Malignant hyperthermia: An investigation of five patients.
Can. Anaesth. Soc. J. 20, 431 - 467 (1973)

28. BROCK, D. J. H.:
Adenylate kinase isoenzyme patterns in tissues of people of different phenotype.
Biochem. Genet. 4, 617 - 625 (1970)

29. BROWN, L.L., and B.A. BRITT:
Malignant hyperthermia.
Sth. med. J. 67, 799 - 804 (1974)

30. BROWNSON, C. and N. SPENCER:
Partial purification and properties of the two common inherited forms of human erythrocyte adenylate kinase.
Biochem. J. 130, 797 - 803 (1972)

31. BRÜCKNER, J.B., J.-W. GETHMANN, M. BARTELS, H.J. EBERLEIN:
Maligne Hyperpyrexie und allgemeine Muskelrigidität unter Allgemeinnarkose.
Z. prakt. Anästh. Wiederbeleb. 20, 307 - 309 (1970)

32. CALLAGHAN, O.H.:
The purification and properties of rabbit - muscle myokinase.
Biochem. J. 67, 651 - 657 (1957)

33. CAROPRESO, P.R., M.A. Gittleman, D.J. REILLY, L.T. PATTERSON:
Malignant hyperthermia associated with enflurane anesthesia.
Arch. Surg. 110, 1491 - 1493 (1975)

34. CHIGA, M. and G.W. E. PLAUT:
An enzyme system from mitochondria catalyzing adenosine diphosphate - adenosine triphosphate and orthophosphate - adenosine triphosphate exchange reactions.
J. biol. Chem. 234, 3059 - 3066 (1959)

35. CHIGA, M. and G.W.E. PLAUT:
Nucleotide transphosphorylases from liver. I. Purification and properties of adenosine triphosphate - adenosine monophosphate transphosphorylase from swine liver.
J. biol. Chem. 235, 3260 - 3265 (1960)

36. CLARKE, I. M.C. and F.R. ELLIS:
Studies of the therapeutic value of procaine and lignocaine in malignant hyperpyrexia.
Br. J. Anaesth. 46, 315 (1974)

37. COLOWICK, S.P.:
Transphosphorylating enzymes of fermentation

38. COLOWICK, S.P.:
Adenylate kinase (Myokinase, ADP Phosphomutase) In: COLOWICK, Methods in enzymology, Vol II, 599 - 604, New York: Academic Press 1955

39. COLOWICK, S.P. and H.M. KALCKAR:
The role of myokinase in transphosphorylations. I. The enzymatic phosphorylation of hexoses by adenyl pyrophosphate.
H. biol. Chem. 148, 117 - 126 (1943)

40. CRISS, W.E.:
Rat liver adenosine triphosphate: adenosine monophosphate phosphotransferase activity. II. Subcellular localization of adenylate kinase isoenzymes.
J. biol. Chem. 245, 6352 - 6356 (1970)

41. CRISS, W.E.:
Relationship of ATP: AMP Phosphotransferase isozymes to tissue respiration.
Arch. Biochem. Biophys. 144, 138 - 142 (1971)

42. CRISS, W.E. and T.K. PRADHAN:
Regulation of adenylate kinases from rat liver, muscle and tumor tissues. In: MARKERT, Isozymes, III. Developmental Biology, 821 - 835, New York, San Francisco, London: Academic Press 1975

43. CRISS, W.E., T.K. PRADHAN, and H.P. MORRIS:
Physical protein regulation of adenylat kinases from muscle, liver, and hepatoma.
Cancer Res. 34, 3+62 - 3+65 (1974)

44. CRISS, W.E., G. LITWACK, H.P. MORRIS, and S. WEINHOUSE:
Adenosine triphosphatase : adenosine monophosphate phosphotransferase isozymes in rat liver and hepatomas.
Cancer Res. 30, 370 - 375 (1970)

45. CSONGRADY, A., I. BAKE, C. PFÄNDER, H. TARMANN, M. SCHNEIDER, E. BUTTAZZONI :
Ein weiterer Fall maligner Hyperpyrexie und seine Behandlung mit Lidocain, Methylprednisxolon und Verapamil.
Anaesthesist 25, 80 -81 (1976)

46. DANIELS, J.C., I. M. POLAYES, R. VILLAR, F.W. HEHRE:
Malignant hyperthermia with disseminated intravascular coagulation during general anesthesia.
Anesth. Analg. (Cleve) 48, 877 - 883 (1969)

47. DENBOROUGH, M.A., J.F.A. FORSTER, M.C. HUDSON, N.G. CARTER, P. ZAPF:
Biochemical changes in malignant hyperpyrexia.
Lancet 1970 I, 1137 - 1138

48. DENBOROUGH, M.A., J.F.A. FORSTER, R.R.H. LOVELL, P.A. MAPLESTONE and J.D. VILLIERS:
Anaesthetic death in a family.
Br. J. Anaesth. 34, 395 - 396 (1962)

49. DERR, R.F. and L. ZIEVE:
Adenylate energy charge: Relation to guanylate energy charge and the adenylate kinase equilibrium constant.
Biochem. biophys. Res.Comm. 49, 1385 -1390 (1972)

50. DUNCAN, W.A.M. and J. RAVENTOS:
The pharmakokinetics of halothane (fluothane) anaesthesia.
Br. J. Anaest. 31, 302 - 315 (1959)

51. ELLIS, F.R.:
Malignant hyperpyrexia.
Anaesthesia 28, 245 - 252 (1973)

52. ELLIS, F.R., I.M.C. CLARKE, E.M. MODGILL:
New causes of malignant hperpyrexia.
Br. med. J. 1, 575 (1975)

53. ELLIS, F.R., I.M .C. CLARKE, T.N. APPLEYARD, R.C.W. DINSDALE:
Malignant hyperpyrexia induced by nitrous oxide and treated with dexamethasone.
Br. med. J. 4, 270 - 271 (1974)

54. ELLIS, F.R., I.M. CLARKE, M. MODGILL, S. CURRLE, D.G. HARRIMAN:
Evaluation of creatinine phophokinase in screening patients for malignant hyperpyrexia.
Br. med. J. 3, 511 - 513 (1975)

55. ERIKSSON, A.W., J. FELLMAN, M. KIRJARINTA, M.-R. ESKOLA, S. SINGH, H.-G. BENKMANN, H.W. GOEDDE, A.E. MOURANT, D. TILLS, W. LEHMANN:
Adenylate kinase polymorphism in populations in Finland (Swedes, Finns, Lapps), in Maris, and in Greenland Eskimos.
Humangenetik 12, 123 - 130 (1971)

56. FABER, P., F. GULLOTTA und F.W. KOENEN:
Klinische und morphologische Befunde bei maligner Hyperthermie.
Dtsch. med. Wschr. 100, 1974 - 1976 (1975)

57. FILDES, R.A. and H. HARRIS:
Genetically determined variation of adenylate kinase in man.
Nature 209, 261 - 263 (1966)

58. FURNISS, P.:
The etiology of malignant hyperpyrexia.
Proc. roy. Soc. Med. 64, 216 - 220 (1971)

59. GJENGSTÖ, H.und A.O. MYKING:
Maligne Hyperpyrexie durch Allgemeinanaesthesie mit möglicher Verbindung zu primärer Muskelkrankheit.
Anaesthesist 20, 306 - 309 (1971)

60. GJESSING, J., J.BARSA and P.J. TOMLIN:
A possible means of rapid cooling in the emergency treatment of malignant hyperpyrexia.
Br. J. Anaesth. 48, 469 - 473 (1976)

61. GLASER, M., W. NULTY and P. R. VAGELOS:
Role of adenylate kinase in regulation of macromolecular biosynthesis in a putative mutant of Escherichia coli defective in membrane phospholipid biosynthesis.
J. Bacteriol. 123, 128 - 136 (1975)

62. GRONERT, G.A. and R.A. THEYE:
Suxamethonium - induced prcine malignant hyperthermia.
Br. J. Anaesth. 48, 513 - 517 (1976)

63. GRONERT, G.A., J.H. MILDE, R.A. THEYE:
Dantrolene in prcine malignant hyperthermia.
Anesthesiology 44, 488 - 495 (1976)

64. GRONERT, G.A., J.J. HEFRON, J.H. MILDE, R.A. TEEYE:
Porcine malignant hyperthermia: role of skeletal muscle in increased oxygen consumption.
Can. Anaesth. Soc. J. 24, 1+3 - 109 (1977)

65. HALL, G.M., J.R. BENDALL, J.N. LUCKE, D. LISTER:
Porcine malignant hyperthermia. II: Heat production.
Br. J. Anaesth. 48, 305 - 308 (1976)

66. HAMPTON, A., L.A. SLOTIN, F. KAPPLER, T. SASAKI and F. PERNI:
Design of substrate - site - directed inhibitors of adenylate kinase and hexokinase. Effect of substrate substituents on affinity for the adenine nucleotide sites.
J. med. Chem. 19, 1371 - 1377 (1976)

67. HARRISON, G.G.:
Althesin and malignant hyperpyrexia.
Br. J. Anaesth. 45, 1019 - 1021 (1973)

68. HARRISON, G.G.:
Recent advances in the understanding of anaesthetic - induced malignant hyperpyrexia.
Anaesthesist 22, 373 - 376 (1973)

69. HARRISON, G.G. and C. VERBURG:
Erythrocyte osmotic fragility in hyperthermia - susceptible swine.
Br. J. Anaesth. 45, 131 - 133 (1973)

70. HELDT, H.W. and K. SCHWALBACHß
The participation of GTP - AMP - p - transferase in substrate level phosphate transfer of rat liver motochondria.
Eur. J. Biochem. I, 199 - 206 (1967)

71. HENDE, C. van den, D. LISTER, E. MUYLLE, L. OOMS and W. OYAERT:
Malignant hyperthermia in Belgian landrace pigs rested or exercised before exposure to halothane.
Br. J. Anaesth. 48, 821 - 829 (1976)

72. HEYCK, H., G. LAUDAHN und C.- J. LÜDERS:
Fermentaktivitätsbestimmungen in der gesunden menschlichen Muskulatur und bei Myopathien. II. Mitteilung: Enzymaktivitätsveränderung im Muskel bei Dystrophia musculorum progressiva.
Klin. Wochenschr. 41, 500 - 509 (1963)

73. HÖIVIK, B., J. STOVNER:
Procaine and malignant hyperthermia.
Lancet 1975 II, 185

74. HOFFMANN - OSTENHOF, O.:
Suggestions for a more rational classification and nomenclature of enzymes.
Adv. Enzymol. 14, 219 - 260 (1953)

75. ISAACS, H. and M.B. BARLOW:
The genetic background to malignant hyperpyrexia revealed by serum creatine phosphokinase estimations in asymptomatic relatives.
Br. J. Anaesth. 42, 1077 - 1084 (1970)

76. ISAACS, H. and J.J.A. HEFFRON:
Morphological and biochemical defects in muscles of human carriers of the malignant hyperthermia syndrome.
Br. J. Anaesth. 47, 475 - 481 (1975)

77. JUNGER, H., W. HELLER, P. KUHNLE, K. SCHMIDT, R. SCHORER:
Adenylatkinase Defizienz als Ursache der Malignen Hyperthermie unter Halothannarkose. In: RINGHEIMER (Hrsg) Kongressbericht, Jahrestagung der DGAW vom 2. - 5. Oktober 1974, 1228 - 1232, Erlangen: Perimed

78. KAESER, H. E.:
Muskulatur. In: SIEGENTHALER, Klinische Pathophysiologie, 3. Aufl., 967 - 984, Stuttgart: Thieme 1976

79. KAFFARNIK, H. und D. KLAUS:
Adenylatkinase, Adenosin-triphosphat - Phosphatase und Kreatinphosphokinase im Serum von Gesunden und Kranken.
Ärztl. Forsch. 16, 361 - 365 (1962)

80. KAFFARNIK, H., W. GRÖSS, E. DAWID, K. DEIBERT und R. JUCHEMS:
Verhalten der Adenylatkinase (Myokinase), des Adenosintriphosphats (ATP) und der K - und Na - Ionen im Serum bzw. Blut unter standardisierter körperlicher Belastung.
Z. ges. exp. Med. 153, 324 - 330 (1970)

81. KENDRICK - JONES, J. and S. V. PERRY:
The enzymes of adenine nucleotide metabolism in developing skeletal muscle.
Biochem. J. 103, 207 - 214 (1967)

82. KERR, D.D., D. W. WINGARD, E.E. GATZ:
Prevention of porcine malignant hyperthermia by epidural block.
Anesthesiology 42, 307 - 311 (1975)

83. KHOO, J.C.:
The kinetics and the multiple molecular forms of adenylate kinases.
Diss. Abstr. Int. B 32, 1992 (1971/72)

84. KHOO, J.C. and P.J. RUSSELL:
Isoenzymes of adenylate kinase in human tissue.
Biochim Biophys. Acta 268, 98 - 101 (1972)

85. KIELLEY, W.W. and R.K. KIELLEY:
Myokinase and adenosinetriphosphatase in oxidative phosphorylation.
J. biol. Chem. 191, 485 - 500 (1951)

86. KITCHIN, S.E. and D.C. WATTS:
Comparison of adenylate kinase from liver and muscle of normal mice and those with an hereditary muscular dystrophy.
Biochim. Biophys. Acta 364, 272 - 283 (1974)

87. KITIYAKARA, A. and J.W. HARMAN:
The cytological distribution in pigeon skeletal muscle of enzymes acting on phosphorylated nucleotides.
J. exp. Med. 97, 553 - 572 (1953)

88. KORTEN, K.:
Maligne Hyperthermie.
Dtsch. Ärztebl. 50, 3279 - 3281 (1972)

89. KRAEMER, R., H.J. MALLACH, H. JUNGER:
Tod in maligner Hyperthermie aus forensisch - medizinischer Sicht.
Med. Welt 29, 379 - 383 (1978)

90. KRESS, L.F. and L. NODA:
Inactivation of rabbit muscle adenosine triphosphate - adenosine 5' - phosphate phosphotransferase by alkylation of methionine residues.
J. biol. Chem. 242, 558 - 564 (1967)

91. KRESS, L.F., V.H. BONO jr. and L. NODA:
The sulfhydrylgroups of rabbit muscle adenosine triphosphate - adenosine monophosphate phosphotransferase.
J. biol. Chem. 241, 2293 - 2300 (1966)

92. KUBO, S. and L. H. NODA:
Adenylate kinase in prcine heart.
Eur. J. Biochem. 48, 325 - 331 (1974)

93. KUMAGAI, H., S. EBASHI, F. TAKEDA:
Essential relaxing factor in muscle other than myokinase and creatin phosphokinase.
Nature 176, 166 (1955)

94. LAUDAHN, G. und H. HEYCK:
Fermentaktivitätsbestimmungen in der gesunden menschlichen Muskulatur und bei Myopathien. I. Mitteilung: Enzymmuster und intrazelluläre Verteilung von Enzymen im gesunden Skelettmuskel.
Klin. Wochenschr. 41, 493 - 500 (1963)

95. LEHMANN, F.-G., K.W. SCHNEIDER und H. MENGE:
Die enzymatische Diagnostik des Herzinfarktes. II. Mitteilung: Die Bestimmung von organspezifischen Enzymen: Kreatinphosphokinase und Myokinase.
Enzym. biol. clin. 6, 36 - 51 (1966)

96. LIENHARD, G.E. and I.I. SECEMSKI:
$P^1,P^5$ - Di (adenosine - 5') pentaphosphate, a potent multisubstrate inhibitor of adenylate kinase.
J. biol. Chem. 248, 1121 - 1123 (1973)

97. LISTER, D., G.M. HALL, J.N. LUCKE:
Malignant hyperthermia: a human and porcine stress syndrome.
Lancet 1975 I, 519

98. LUCKE, J.N., D. LISTER:
Althesin and malignant hyperthermia.
Br. J. Anaesth. 47, 419 (1975)

99. LUCKE: J.N., G.M. HALL, D. LISTER:
Porcine malignant hyperthermia. I. Metabolic and physiolgical changes.
Br. J. Anaesth. 48, 297 - 304 (1976)

100. LÜSTORFF, J. and E. SCHLIMME:
Does an inhibitor of mitochondrial adenylate kinase also affect oxidative phosphorylation.
Experienta 32, 298 - 299 (1976)

101. MAHOWALD, T.A., E.A. NOLTMANN and S.A. KUBY:
Studies on adenosine triphosphate transphosphorylases.I. Amino acid composition os adenosine triphosphate - adenosine 5' - phosphate transphosphorylase (Myokinase).
J. biol. Chem. 237, 1138 - 1145 (1962)

102. MAHOWALD, T.A., E.A. NOLTMANN and S.A. KUBY:
Studies on adenosine triphosphorylases. III. Inhibition reactions.
J. biol. Chem. 237, 1535 - 1548 (1962)

103. MAINZER, K., B. MORSCHES und H. HOLZMANN:
Myokinase - (Adenylatkinase -) Aktivität im Serum bei intravasaler Hämolyse.
Ärztl. Forsch. 26, 426 - 431 (1972)

104. MARKLAND, F.S. and C.L. WADKINS:
Adenosine - triphosphate - adenosine 5' - monophosphate phosphotransferase of bovine liver mitochondria. I. Isolation and chemical properties.
J. biol. Chem. 241, 4124 - 4135 (1966)

105. MARKLAND, F.S. and C.L. WADKINS:
Adenosine triphosphate - adenosine 5' - monophosphate phosphotransferase of bovine liver mitochondria. II. General kinetic and structural properties.
J. biol. Chem. 241, 4136 - 4145 (1966)

106. MATTENHEIMER, H. and U. MOHR:
Ciliotoxicity of cigarette smoke and adenylate kinase.
Z. klin. Chem. klin. Biochem. 13, 325 - 326 (1975)

107. MENZEL, H., F. GULOTTA, B. HELPAP, K. FREIBERGER:
Bericht über zwei Fälle von maligner Hyperthermie mit unterschiedlichem Verlauf.
Prakt. Anaesth. 10, 227 - 235 (1976)

108. MODIANO, G., R. SCOZZARI, F. GIGLIANI, C. SANTOLAMAZZA, G.F. SPENNATI and P. SAINI:
Enzyme activity in two red cell adenylate kinase pheotypes.
Am. J. hum. Genet. 22, 292 - 297 (1970)

109. MOULDS, R.F.W.:
Malignant hyperpyrexia.
Lancet 1975 I, 681

110. MOULDS, R.F.W., M.A. DENBOROUGH:
Biochemical basis of malignant hyperpyrexia.
Br. med. J. 2, 241 - 244 (1974)

111. NELSON, T.E., D.M. BEDELL, E.W. JONES:
Porcine malignant hyperthermia.
Anesthesiology 42, 301 - 306 (1975)

112. NODA, L.:
Adenosine - triphosphate - adenosine - monophosphate transphosphorylase. III. Kinetic studies.
J. biol. Chem. 232, 237 - 250 (1958)

113. NODA, L.: Nucleoside triphosphate - nucleoside monophosphokinases. In: BOYER, The enzyms, Vol. 6, 2nd. edn., 139 - 149, New York and London: Academic Press 1962

114. NODA, L.: Adenylate kinase. In: BOYER, The enzymes, Vol, VIII, 3rd. edn., 279 - 305, New York and London: Academic Press 1973

115. OLIVER, I.T.:
A spectrophotometric method for the determination of creatine phosphokinase and myokinase.
Biochem. J. 61, 116 - 122 (1955)

116. OPPERMANN, CH., I. PODLESCH und R. PURSCHKE:
Maligne Hyperthermie während Allgemeinanaesthesie mit Rigor, Myoglobinurie und Gerinnungsstörung.
Anaesthesist 20, 315 - 322 (1971)

117. PAN, T.-H., A.R. WOLLACK, J.A. DeMARCO:
Malignant hyperthermia associated with enflurane anesthesia. A case report.
Anesth. Analg. (Cleve) 54, 47 - 49 (1975)

118. PEDERSEN, P.L., J.W. GREENAWALT, T.L. CHAN and H.P. MORRIS:
A comparison of some ultrastructural and biochemical properties of mitochondria from Morris hepatomas 9618 A, 7800, 3924 A.
Cancer Res. 30, 2620 - 2626 (1970)

119. PETER, H. J., J. ZAPF, E.R. FROESCH, H. EPPENBERGER, K. BERNHARD und G. HOSSLI:
Intensiv - Report.
2. Zur Früherkennung der malignen Hyperthermie.
Klinikarzt 5,9, 770 - 771 (1976)

120. POVEY, S., C.A. SLAUGHTER, D.E. WILSON, I.P. GORMLEY, K.E. BUCKTON, P. PERRY and M. BORROW:
Evidence for the assignment of the loci $Ak_1$, $AK_3$ and $ACON_s$ to chromosome 9 in man.
Ann. hum. Genet. 39, 413 - 422 (1976)

121. PRADHAN, T.K., W.E. CRISS and H.P. MORRIS:
Kinetic regulation of adenylate kinases from muscle, liver and hepatoma.
Cancer Res. 34, 3058 - 3061 (1974)

122. PURICH, D.L. and H.J. FROMM:
Inhibition of rabbit skeletal muscle adenylate kinase by the transition state analogue, $P^1$, $P^4$ - di (adenosine - 5') tetraphosphate.
Biochim. Biophys. Acta 276, 563 - 567 (1972)

123. PURICH, D.L. and H. J. FROMM:
Additional factors influencing enzyme responses to the adenylate energy charge.
J. biol. Chem. 248, 461 - 466 (1973)

124. RAPLEY, S. and H. HARRIS:
Red cell adenylate kinase activity in $AK_1$ and $AK_{2-1}$ phenotypes.
Ann. hum. Genet. 33, 361 - 364 (1970)

125. ROERVIK, S., J. STOVNER:
Kextamine - induced acidosis, fever, and creatine - kinase rise.
Lancet 1974 II, 1384 - 1385

126. RYAN, D.W. and T.N. APPLEYARD:
Malignant hyperpyrexia: Investigation of a family after a fatal case.
Br. J. Anaesth. 47, 1001 - 1004 (1975)

127. SACHSENHEIMER, W., R.S. GOODY und R.H. SCHIRMER:
Elimination und Exkretion von Adenylatkinasen nach Zellschädigungen.
Klin. Wochenschr. 53, 617 - 622 (1975)

128. SACHSENHEIMER, W. E.F. PAI, G.E. SCHULZ and R.H. SCHIRMER:
Halothane binds in the adenine - specific niche of crystalline adenylate kinase.
FEBS Lett. 79, 310 - 312 (1977)

129. SAPICO, V., G. LITWÁCK, and W. E. CRISS:
Purification of rat liver adenylate kinase isoenzyme II and comparison with isoenzyme III.
Biochim. Biophys. Acta 258, 436 - 445 (1972)

130. SCHIRMER, R.H. and E. THUMA:
Sensitivity of adenylate kinase isozymes from normal and dystrophic human muscle to sulfhydryl reagents.
Biodhim. Biophys. Acta 268, 92 - 97 (1972)

131. SCHMIDT, F.H.:
Über die Bestimmung der Myokinase -(Adenylatkinase) Aktivität im Serum.
Klin. Wochenschr. 42, 476 - 478 (1964)

132. SCHMITT, J., K. SCHMIDT and H. RITTER:
Hereditary malignant hyperpyrexia associated with muscle adenylate kinase deficiency.
Humangenetik 24, 253 - 257 (1974)

133. SCHREIBER, F.-K.:
Myokinasebestimmungen in der Diagnostik des Herzinfarkts.
Klin. Wochenschr. 42, 478 - 483 (1964)

134. SCHULZ, G.E., M. ELZINGA, F. MARX and R.H. SCHIRMER:
Three - dimensional structure of adenyl kinase.
Nature 250, 120 - 123 (1974)

135. SIKEVITZ, P. and VAN R. POTTER:
The adenylate kinase of rat liver mitochondria.
J. biol. Chem. 200, 187 - 196 (1953)

136. SORENSEN, S.A.: Adenylate kinase, adenosine deaminase and phosphoglucomutase phenotypes in a Danish population.
Hum. Hered. 22, 362 - 371 (1972)

137. STIER, A.:
Abbau des Halothans.
Therapiewoche 41, 3714 (1973)

138. SUGANO, T. and O. NAGAI:
Effect of magnesium ion on brain mitochondrial respiration. I. Activation of brain mitochondrial phosphotransferases by magnesium ions.
J. Biochem. 70, 417 - 427 (1971)

139. SUTHERLAND, F.S., J.R. CARTER:
Malignant hyperthermia during enflurane anesthesia.
J. Tenn. med. Assoc. 68, 795 - 796 (1975)

140. SZASZ, G., W. GERHARDT and W. GRUBER:
Creatine kinase in Serum: 3. Further study of adenylate kinase inhibitors.
Clin. Chem. 23, 1888 - 1892 (1977)

141. SZEINBERG, A., S. GAVENDO, D. CAHANE:
Erythrocyte adenylate - kinase deficiency.
Lancet 1969 I, 315 - 316

142. SZEINBERG, A., D. KAHANA, S. GAVENDO, J. ZAIDMAN and J. BEN - EZZER:
Hereditary deficiency of adenylate kinase in red blood cells.
Acta Haemato. 42, 111 - 126 (1969)

143. THORSTENSSON, A., K. ELWIN, B. SJÖDIN, J. KARLSSON:
Isozymes of creatine phosphokinase and myokinase in human heart and skeletal muscle.
Scand. J. clin. Lab. Invest. 36, 821 - 826 (1976)

144. THUMA, E., R.H. SCHIRMER and I. SCHIRMER:
Preparation and characterization of a crystalline human ATP : AMP phosphotransferase.
Biochim. Biophys. Acta 268, 81 - 91 (1972)

145. TILLS, D., J.L. van den BRANDEN, V.R. CLEMENTS and A.E. MOURANT:
The world distribution of electrophoretic variants of the red cell enzyme adenylate kinase.
Hum. Hered. 20, 517 - 522 (1970)

146. TODD, J.K. and D.N. BARON:
Adenylate kinase in human tissues. London: Pitman Medical 1965

147. VERGNES, H. and D. GOURDIN:
Further data on the distribution of some red cell enzyme variants in african populations.
Hum. Hered. 24, 463 - 471 (1974)

148. VOLFIN, P.:
Effect of insulin on adenylate kinase activity and glycolysis rate of the isolated rat diaphragm in the absence of added glucose.
FEBS Lett. 9, 317 - 320 (1970)

149. WHITBY, L.G.:
Biochemical screening tests for the anaesthesist.
Br. J. Anaesth. 46, 564 - 569 (1974)

150. WILSON, D.E. Jr., S. POVEY and H. HARRIS:
Adenylate kinases in man: evidence for a third locus.
Ann. hum. Genet. 39, 345 - 313 (1976)

151. WINGARD, D.W.:
Malignant hyperthermia: A human stress syndrome ?
Lancet 1974 II, 1450 - 1451

152. WOLLENBERGER, A., O. RISTAU und G. SCHOFFA:
Eine einfache Technik der extrem schnellen Abkühlung grösserer Gewebestücke.
Pfluegers Arch. 270, 399 - 412 (1960)

153. ZECH, R.:
Enzymologie
Z. Allg. Med. 53, 792 - 797 (1977)

154. ZINDLER, M., B.A. BRITT, J. B. BRÜCKNER, W. DICK, F.R. ELLIS, R. PURSCHKE, N. SONNENKLAR, und E.K. ZSIGMOND:

Maligne Hyperthermie. Panel Diskussion: 5. Sept. 1973, XIII. Gemeinsame Tagung der Deutschen, Schweizerischen und Österreichischen Gesellschaften für Anaesthesiologie und Reanimation, 5. - 8. Sept. 1973, Linz/Donau

155. ZINGANELL, K., M. SAJONS, G. HAMMAMI:

Abortive Verlaufsform der malignen Hyperpyrexie ? oder Abnorme Reaktion auf Succinylcholin.

Prakt. Anaesth. 10, 222 - 227 (1975)

156. ZSIGMOND, E. K. and W. H. STARKWEATHER:

Abnormal serum and muscle creatine phosphokinase (CPK) isoenzyme pattern in a family with malignant hyperthermia.

Anaesthesist 22, 16 - 22 (1973)

Am 18. April 1950 wurde ich, Erich Reuter, als Sohn des Karl Reuter und seiner Ehefrau Emma, geb. Kärcher in Niedernhall geboren.

Ebenda besuchte ich die Volksschule von 1957 - 1961.

Danach wechselte ich zum Gymnasium in Künzelsau über, wo ich im Jahre 1969 das Abitur ablegte.

Nach dreijähriger Bundeswehrzeit (Abschluss mit der Gesellenprüfung im Radio- und Fernsehtechniker - Handwerk) und einem Jahr Studium der Elektrotechnik, wurde ich im Wintersemester 1973 in Hohenheim als Student der Humanmedizin eingeschrieben. 1974 setzte ich an der Universität Tübingen das Studium fort.

Im August 1975 legte ich dort auch die ärztliche Vorprüfung ab.

Nach einem Jahr, im August 1976, folgte der 1. Abschnitt und im März 1979 der 2. Abschnitt des Staatsexamens.

Nach dem Praktischen Jahr im Robert - Bosch - Krankenhaus in Stuttgart beendete ich das Studium am 24.4.1980 mit dem 3. Teil des Staatsexamens.